



Rôle de la protéine FBXW4 dans le complexe SCF et dans le développement du split hand/split foot malformation de type 3 (SHFM3)

Mémoire

Samira Slimani

Maîtrise en sciences cliniques et biomédicales - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Samira Slimani, 2020

**Rôle de la protéine FBXW4 dans le complexe
SCF et dans le développement du *split
hand/split foot malformation* de type 3
(SHFM3)**

Mémoire

Samira Slimani

Sous la direction de :

Paul Isenring, directeur de recherche

Résumé

La dégradation des protéines, appelée protéolyse, est un mécanisme essentiel pour le fonctionnement et la survie cellulaire. Elle se fait en grande partie grâce à l'ubiquitination des protéines qui permet au protéasome de les reconnaître et de les cliver. Dans le cadre de ce projet, et ce, à partir de deux cas cliniques, j'ai étudié le rôle la protéine *F-box/WD repeat-containing protein 4* (FBXW4) dans ce processus de dégradation. Les patients étaient tous deux atteints d'un syndrome polymalformatif caractérisé par une ectrodactylie appelé *split hand/split foot malformation* de type 3 (SHFM3) et par une insuffisance rénale chronique. Ils étaient aussi tous deux porteurs d'une mutation P376Q dans FBXW4. Comme on suspectait déjà que FBXW4 appartienne à un complexe d'ubiquitination, nous avons émis l'hypothèse que la mutation affectait l'assemblage de ce complexe et causait ainsi les désordres cliniques identifiés. J'ai donc reproduit cette mutation *in vitro* ainsi que d'autres à cette position pour en étudier les effets dans le système d'expression des ovocytes de *Xenopus laevis*. J'ai constaté que FBXW4 était organisé en homomères et que la nature du résidu 376 jouait un rôle dans cet assemblage. J'ai aussi observé que la nature du résidu 376 affectait aussi la liaison de FBXW4 avec Skp1, une autre protéine qui se retrouve dans le complexe. Ces travaux ont ainsi permis d'en arriver aux conclusions suivantes : 1) la mutation des patients affecte l'assemblage oligomérique de FBXW4, 2) elle est donc fort possiblement causale, et 3) elle entraînerait la maladie dû à un désordre de l'ubiquitination de certaines protéines durant le développement.

Abstract

Protein degradation, also known as proteolysis, is essential for cell function and survival. It is most often achieved through the ubiquitination of proteins, a process that allows the proteasome to recognize and cleave such proteins. In this project, I studied two clinical cases in which the protein F-box/WD repeat-containing protein 4 (FBXW4) was believed to play a role. Both patients suffered from a polymalformative syndrome characterized by an ectrodactyly called type 3 split hand/split foot malformation (SHFM3) and chronic renal failure. Both patients also bore a P376Q mutation in FBXW4. As previous studies were consistent with the possibility that FBXW4 was part of an ubiquitination complex, we hypothesized that the mutation affected the assembly of this complex and resulted in the observed clinical disorders. I therefore reproduced the mutation *in vitro* among others at this location and characterized the effects of such mutations in *Xenopus laevis* oocyte expression system. I found that FBXW4 was organized in homooligomers and that the nature of the residue of position 376 played a role in assembly of the FBXW4 containing complex. I also found that the nature of residue 376 affected the binding of FBXW4 to another protein in the complex, that is, to Skp1. These results allow us to draw the following conclusions: 1) the mutation identified affects the oligomeric assembly of FBXW4, 2) it is thus very likely to be causative, and 3) it could cause an ubiquitination disorder in which certain proteins are not properly degraded during development.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements.....	x
INTRODUCTION	1
1. La protéolyse	2
1.1. Le système lysosomal	2
1.2. Le système ubiquitine-protéasome (UPS).....	3
1.2.1. Historique.....	3
1.2.2. Mécanisme d'action de l'UPS	3
1.3. Rôles de la dégradation.....	5
1.4. Maladies causées par un défaut de la protéolyse	5
2. Ubiquitine	6
2.1. Historique.....	6
2.2. Structure	7
2.3. Conservation entre les espèces	7
2.4. Rôles.....	8
2.5. Processus d'ubiquitination	8
2.6. Protéines apparentées à l'ubiquitine	9
3. Les complexes ubiquitine-ligase E3	9
3.1. Les complexes HECT	10
3.2. Les complexes RING-finger	10
3.2.1. Complexes CRL.....	10
3.2.1.1. Structure	10
4. Complexes SCF/CRL1	12
4.1. Historique.....	12
4.2. Structure	13
4.2.1. Enzyme conjuguée à l'ubiquitine E2	13
4.2.2. RING-box protein 1 (RBX1).....	13
4.2.3. Cullin1 (Cul1)	14
4.2.4. S-phase kinase associated protein 1 (Skp1).....	14
4.2.5. Protéine F-box	14
4.2.5.1. Domaine F-box	14
4.2.5.2. Domaine WD40	14
4.3. Substrats des complexes SCF	15
4.4. Régulation du complexe SCF.....	15
4.4.1. Activation du complexe.....	15
4.4.1.1. NEDD8.....	15
4.4.1.2. Processus de neddylation	15
4.4.2. Inhibition du complexe SCF.....	16
4.4.2.1. CAND1.....	16
4.4.2.2. Signalosome COP9	17
4.4.3. Dimérisation des complexes SCF	19
5. La protéine F-box/WD repeat-containing protein 4 (FBXW4)	20
5.1. Structure	20
5.2. Interactome.....	20
5.3. Rôles.....	21

5.4. SHFM3.....	21
5.4.1. Causes.....	21
6. Cas cliniques	22
6.1. Premier cas clinique	23
6.1.1. Sclérose glomérulaire focale et segmentaire	24
6.2. Deuxième cas clinique.....	24
7. Hypothèses et objectifs	24
Chapitre 1: MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
1. Vecteur utilisé pour les constructions	26
2. Clonage de Skp1, FBXW4 et ubiquitine	26
3. Création des constructions Ha-hUbiquitine, hFBXW4Myc, hFBXW4Flag et hSkp1Flag	27
3.1. Ha-hUbiquitine	27
3.2. hFBXW4Myc et hFBXW4Flag	27
3.3. hSkp1Flag.....	28
4. Mutagenèse de FBXW4	28
4.1. Stratégies de mutagenèse.....	28
4.2 Choix des mutants	29
5. Validation	30
5.1. Vérification des séquences.....	30
6. Expression dans les ovocytes de <i>Xenopus laevis</i>	30
6.1. Validation de l'expression	30
6.1.1. Immunofluorescence	31
6.1.2. Western blot.....	31
7. Co-immunoprécipitations	32
8. Quantification des résultats par densitométrie	33
9. Statistiques	33
Chapitre 2: RÉSULTATS.....	34
1. Immunofluorescences	34
1.1. Constructions FBXW4Myc.....	34
1.2. Constructions de FBXW4Flag	35
1.3. Skp1.....	36
1.4. Ubiquitine.....	36
2. Co-immunoprécipitations	37
2.1. Co-immunoprécipitations entre FBXW4 et Skp1	37
2.1.1. IP FBXW4, détecté Skp1	37
2.1.2. IP Skp1, détecté FBXW4.....	38
2.2. Co-immunoprécipitations entre FBXW4 sauvage et les différents mutants de FBXW4	39
2.2.1. IP Flag, détecté Myc.....	39
2.2.2. IP Myc, détecté Flag.....	40
2.3. Co-immunoprécipitations entre les différents mutants de FBXW4.....	41
2.3.1. IP Flag, détecté Myc.....	41
2.3.2. IP Myc, détecté Flag.....	42
2.4. Patrons d'ubiquitination avec les différents mutants de FBXW4.....	43
Chapitre 3: DISCUSSION.....	45
CONCLUSION.....	48
Bibliographie	49

Liste des figures

¹ Les composantes séparées des figures proviennent du site libre de droits d'auteur *Smart Servier Medical Art*. L'assemblage de la figure a été fait par l'auteure du mémoire.

INTRODUCTION

Figure 1 : Structure du complexe SCF ¹	1
Figure 2 : Conjugaison et transfert de molécules d'ubiquitine sur le substrat par les enzymes E1, E2 et E3 ¹	4
Figure 3 : Dégradation des protéines en acides aminés par le protéasome (UPS) et recyclage de l'ubiquitine ¹	5
Figure 4 : Structure 3D de l'ubiquitine incluant les ponts hydrogènes, l'hélice alpha et les feuillets bêta.	7
Figure 5 : Séquences en acides aminés de l'ubiquitine chez différentes espèces.	8
Figure 6 : Système ubiquitine-protéasome (UPS) : Mécanisme global d'ubiquitination des protéines et de dégradation par le protéasome ¹	9
Figure 7 : Configuration générale des complexes SCF/CRL ¹	10
Figure 8 : Structure du complexe SCF/CRL ¹	13
Figure 9 : Inhibition de l'assemblage du complexe SCF par CAND1 ¹	17
Figure 10 : Activation du complexe SCF par la protéine NEDD8 et inactivation par le signalosome COP9 ¹	18
Figure 11 : Structure de la protéine FBXW4 et position des domaines F-box et WD40	20
Figure 12 : Interaction entre l'AER et la ZPA dans le développement des membres	22
Figure 13 : Modèle prédit de FBXW4.	22
Figure 14 : Phénotype du cas index.	23
Figure 15 : Pedigree du cas index.	23

Chapitre 1 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 16 : Résultats des mutagenèses sur la séquence en acides aminés de FBXW4	29
Figure 17 : Schéma du principe général d'une co-immunoprécipitation	32

Chapitre 2 : RÉSULTATS

Figure 18 : Résultats des immunofluorescences des constructions de FBXW4Myc	34
Figure 19 : Résultats des immunofluorescences des constructions de FBXW4Flag	35
Figure 20 : Résultats des immunofluorescences de la construction Skp1Flag	36
Figure 21 : Résultats des immunofluorescences de la construction Ha-ubiquitine	36
Figure 22 : Résultats des co-immunoprécipitations entre FBXW4 et Skp1 (IP FBXW4, détecté Skp1).....	37
Figure 23 : Résultats des co-immunoprécipitations entre FBXW4 et Skp1 (IP Skp1, détecté FBXW4)	38
Figure 24 : Résultats des co-immunoprécipitations entre FBXW4 sauvage et les différents mutants de FBXW4 (IP Flag, détecté Myc).....	39
Figure 25 : Résultats des co-immunoprécipitations entre FBXW4 sauvage et les différents mutants de FBXW4 (IP Myc, détecté Flag)	40
Figure 26 : Résultats des co-immunoprécipitations entre les mutants de FBXW4 (IP Flag, détecté Myc)	41
Figure 27 : Résultats des co-immunoprécipitations entre les mutants de FBXW4 (IP Myc, détecté Flag)	42
Figure 28 : Résultats des patrons d'ubiquitination en présence des différents mutants de FBXW4.....	43

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Tableau 1 : Schéma des différents complexes de type RING-finger ¹	11
Tableau 2 : Nombre d'adaptateurs de substrats estimé chez l'humain	12

Chapitre 1 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau 3 : Liste des constructions utilisées	26
Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés pour la construction de Ha-hUbiquitine	27
Tableau 5 : Oligonucléotides utilisés pour les constructions de FBXW4	27
Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés pour la construction de Skp1	28
Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés pour le séquençage des constructions	28
Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse de FBXW4	29
Tableau 9 : Structure des acides aminés en position 376 des différents mutants de FBXW4 et propriétés physicochimiques	30
Tableau 10 : Composantes de la solution Barth	31
Tableau 11 : Composantes de la solution Miki	31
Tableau 12 : Résumé des co-immunoprécipitations	33

Liste des abréviations

ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AER	<i>apical ectodermal ridge</i> (crête ectodermique apicale)
AMP	adénosine monophosphate
APC/C	<i>anaphase promoting complex/cyclosome</i>
APF-1	<i>ATP-dependent proteolytic factor</i>
ARNc	acide ribonucléique complémentaire
ATP	adénosine triphosphate
β -caténine	bêta caténine
BTB	<i>broad-Complex, Tramtrack and Bric a brac</i>
B-TrCP	<i>beta-transducin repeat containing E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
CAND1	<i>cullin Associated And Neddylation Dissociated 1</i>
Cdc4	<i>cell division control protein 4</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Co-IP	co-immunoprécipitation
COP9	<i>constitutive photomorphogenesis 9</i>
CRL	<i>cullin-RING-E3-ligases</i>
C-terminal	carboxyle-terminal
Cul1	culline 1
Cul2	culline 2
Cul3	culline 3
Cul4	culline 4
Cul5	culline 5
Cul5 ^{Ctd}	complexe CRL5 comprenant la protéine Ctd comme adaptateur de substrat
DCAF	<i>DDB1 and CUL4-associated factors</i>
DDB1	<i>DNA damage-binding protein 1</i>
E1	ubiquitin-activating enzyme
E2	ubiquitin-conjugating enzyme
E3	ubiquitin ligase
EloB	Élongine B
EloC	Élongine C
FBXW4	<i>F-Box And WD Repeat Domain Containing 4</i>
FBXW7	<i>F-box and WD repeat domain containing 7</i>
h	humain
HECT	<i>homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus</i>
HEK-293	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>
Hh	hedgehog
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	immunoglobuline G
I κ Ba	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
kDa	kilodalton

NEDD8	<i>neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8</i>
Nf-kB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
N-terminal	amino-terminus
PPi	pyrophosphates
RBX1	<i>RING-box protein 1</i>
RBX2	<i>RING-box protein 2</i>
RING-finger	<i>really Interesting New Gene finger domain</i>
SCF	<i>skp1-Cullin-F-box</i>
SCF/CRL	skp1, cullin, F-box / Cullin-RING ubiquitin ligases
SCF/Cdc4	skp1, Cullin, F-box (où la protéine F-box est Cdc4)
SCF/FBXW4	skp1, cullin, F-box (où la protéine F-box est FBXW4)
SCF/FBXW7	skp1, cullin, F-box (où la protéine F-box est FBXW7)
SCF/ β -TrCP	skp1, cullin, F-box (où la protéine F-box est β -TrCP)
SHFM3	<i>split-hand/split-foot malformation type 3</i>
Skp1	<i>S-Phase Kinase Associated Protein 1</i>
SLA	sclérose latérale amyotrophique
SOCS-box	<i>suppressor of cytokine signalling box</i>
UPS	<i>ubiquitin/Proteasome System</i>
VHL-box	<i>Von Hippel-Lindau box</i>
WD40	domaine WD40
Wnt	wingless Int-1
WT	<i>wild type</i> (protéine sauvage)
ZPA	<i>zone of polarizing activity</i> (zone d'activité polarisante)

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Paul Isenring, pour son encadrement pendant mon projet de maîtrise. Il a toujours été très disponible et à l'écoute afin que je puisse mener à bien ce projet. Je le remercie de m'avoir permis de travailler sur ce projet unique qui relie à la fois la médecine et la recherche fondamentale. Ce fut un réel bonheur pour moi de pouvoir faire ma maîtrise sur un sujet aussi intéressant.

Je souhaite également remercier mes collègues de laboratoire Andrée-Anne Marcoux, Rachelle Frenette-Cotton, Marie-Jeanne Fiola, Laurence Tremblay et Micheline Noël. Je les remercie pour leur soutien, leurs judicieux conseils, leur aide, leur patience et leur gentillesse tout au long de ce projet. J'ai adoré travailler avec elles. Je ne saurais les remercier assez. Merci également au personnel du centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec pour leurs excellents services.

Ensuite, une mention spéciale à ma famille pour leur amour et leur soutien inconditionnels. Merci à mes parents, Fayçal et Houria, qui ont toujours su trouver les bons mots pour me motiver même dans les moments plus difficiles, et ma sœur Hakima sans qui je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui. Je vous aime. À mes fabuleux amis Vanessa et Vince, sur qui je peux toujours compter. Merci d'être qui vous êtes. Votre amitié est le plus beau des cadeaux. À mon conjoint Vincent, merci de ta patience et de ton soutien.

Finalement, je remercie le Fonds de recherche du Québec (FRQS) pour son soutien financier au cours des deux dernières années.

INTRODUCTION

Les protéines sont utilisées par tous les êtres vivants pour accomplir diverses fonctions biologiques (Alberts *et al.*, 2002). Elles sont hautement régulées afin de pouvoir assurer ces fonctions. Un dérèglement de la qualité et de la quantité de protéines cellulaires peut donc s'avérer délétère et mener à des maladies (Hanna *et al.*, 2019).

La cellule a recours à un processus d'hydrolyse des protéines, connu sous le nom de protéolyse, afin de les dégrader (Ehrmann et Clausen, 2004). Ce processus est lui aussi hautement régulé par plusieurs autres protéines (Hanna *et al.*, 2019). Parmi celles-ci, on retrouve celles qui font partie du système ubiquitine-protéasome (UPS). Celui-ci est le système de dégradation le plus répandu chez les mammifères. Il permet le transfert d'une molécule, appelée ubiquitine, sur un substrat afin que celui-ci soit reconnu comme un signal de dégradation par la cellule (Ciechanover, 2005; Hershko *et al.*, 1983). Le substrat est alors envoyé au protéasome où il sera détruit. Ce système fonctionne grâce à des complexes appelés ubiquitine ligase E3. (Kleiger et Mayor, 2014)

Il existe deux grandes familles de complexes ubiquitine ligase E3 pouvant assurer le processus d'ubiquitination : ceux contenant des motifs HECT et ceux contenant des motifs RING-finger (Ravid et Hochstrasser, 2008). Dans ce mémoire, il sera question de la deuxième catégorie. Parmi les complexes à motifs RING-finger, il existe une sous-catégorie appelée SCF/CRL1 (*Skp1-Cullin-F-box/Cullin-RING-E3-ligases*), plus communément appelé SCF, dont la structure est représentée ci-dessous.

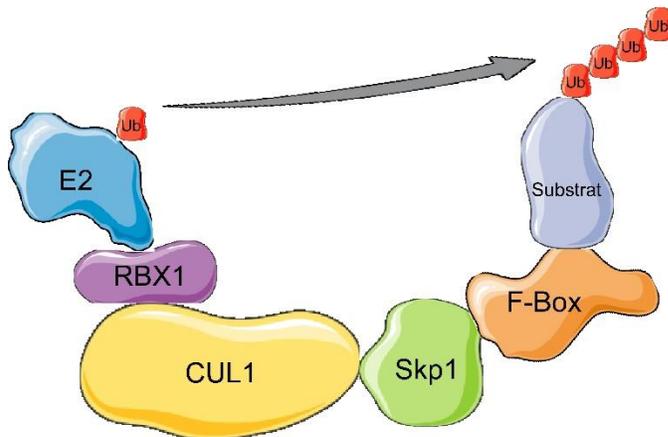


Figure 1 : Structure du complexe SCF¹

La spécificité des complexes SCF est assurée par la sous-unité contenant un domaine appelé F-box (Deshaies, 1999). Cette sous-unité est interchangeable puisqu'il existe plusieurs dizaines d'isoformes chez l'humain (Petroski et Deshaies, 2005; Lee et Zhou, 2007). Ainsi, un même complexe SCF peut se lier avec plusieurs sous-unités F-box différentes et peut dégrader une panoplie de substrats

(Deshaies, 1999). Parmi les différentes protéines à domaine F-box, on retrouve la protéine FBXW4 (*F-box/WD repeat-containing protein 4*) qui assurerait l'ubiquitination de certains substrats au sein du complexe. Cette protéine serait également impliquée dans le développement embryonnaire des membres chez l'humain (Friedli *et al.*, 2008). Deux cas cliniques présentant une mutation ponctuelle dans le gène codant pour FBXW4 ont également été rapportés.

Le présent mémoire traitera du rôle présumé de FBXW4 au sein du complexe SCF ainsi que dans le processus d'ubiquitination. Grâce à la mutation ponctuelle rapportée chez les cas cliniques, nous souhaitons établir de façon claire la fonction de FBXW4 dans la dégradation protéique.

1. La protéolyse

La dégradation protéique, aussi appelée protéolyse, est un processus cellulaire permettant de réduire les protéines par des réactions enzymatiques en leurs plus petites composantes, soit des acides aminés (Cooper, 2000). Elle s'effectue grâce à des réactions d'hydrolyse qui brisent les liens peptidiques de la protéine (Hill, 1965). Il s'agit de réactions exergoniques puisque la dégradation entraîne une libération d'énergie (Goldberg et St John, 1976). La protéolyse est un processus essentiel puisque les besoins en protéines des organismes vivants sont en constant changement vu la nécessité de répondre à des besoins métaboliques spécifiques (Liu et Barrett, 2002).

La protéolyse joue également un rôle crucial dans l'élimination des protéines surnuméraires, mal repliées ou oxydées (Hanna *et al.*, 2019). En effet, les protéines se trouvant en trop grand nombre dans l'organisme et qui ne sont plus utiles ou fonctionnelles seront dégradées par des voies cataboliques (Kleiger et Mayor, 2014). Les acides aminés obtenus de cette dégradation pourront ensuite être utilisés pour créer de nouvelles protéines qui pourront répondre à d'autres besoins (Davies et Humphrey, 1978).

La dégradation peut être effectuée par deux voies : le système de dégradation lysosomiale et le système ubiquitine-protéasome (UPS) (Ravid et Hochstrasser, 2008). C'est le système UPS qui fera l'objet de ce mémoire.

1.1. Le système lysosomal

Le système protéolytique lysosomal est basé sur la digestion de substrats par des organites cellulaires appelés lysosomes (Eskelinen et Saftig, 2009). Dans la cellule, certaines particules protéiques à dégrader sont d'abord enfermées dans des compartiments membranaires appelées autophagosomes. Ces derniers fusionnent ensuite avec les lysosomes qui renferment plusieurs types de protéases. Une fusion permet ultimement de mettre en contact les particules contenues dans les autophagosomes avec les enzymes de digestion du lysosome ce qui entraîne la dégradation des particules (Huber et Teis, 2016). Autrefois perçu comme un système de dégradation générique, la

dégradation lysosomiale est aujourd'hui considérée comme spécifique et complémentaire au système UPS (Khaminets *et al.*, 2016).

1.2. Le système ubiquitine-protéasome (UPS)

1.2.1. Historique

Le système UPS a été découvert dans les années 80 par Hershko, Ciechanover et Rose (Hersko *et al.*, 1980). Il est le système majoritairement impliqué dans la protéolyse intracellulaire chez les mammifères et régule tous les processus biologiques de la cellule (Hershko et Ciechanover, 1998). Vu son rôle crucial dans la protéolyse, l'UPS a valu à ses découvreurs le prix Nobel de chimie en 2004 (Neefjes *et al.*, 2004). Ce système est très sélectif et spécifique quant à la dégradation des substrats. Il repose sur la liaison d'une molécule, l'ubiquitine, sur une protéine cible afin de permettre sa reconnaissance par le protéasome. Cette reconnaissance conduit à la dégradation subséquente de la cible (Hershko *et al.*, 1980). L'ubiquitine sera discutée plus en détails à la section 2.

1.2.2. Mécanisme d'action de l'UPS

Grâce à plusieurs complexes enzymatiques spécifiques, l'UPS permet de catalyser la liaison de l'ubiquitine sur différents substrats. Ce processus, appelé ubiquitination, se fait grâce à trois réactions successives, soit l'activation, la conjugaison et la liaison de l'ubiquitine. Chacune de ces étapes est régulée par une enzyme différente soit l'enzyme activatrice de l'ubiquitine E1, l'enzyme conjuguée à l'ubiquitine E2 et l'ubiquitine ligase E3 respectivement (Ciechanover et Ben-Saadon, 2007; Cadwell et Coscoy, 2005).

L'activation de l'ubiquitine se fait plus précisément par une hydrolyse préalable de l'ATP qui permet à l'enzyme E1 de lier l'ubiquitine de manière covalente sur un de ses résidus cystéine actif afin de l'activer. La conjugaison de l'ubiquitine se fait ensuite par E1 qui en permet le transfert sur une cystéine de l'enzyme E2 (Wenzel *et al.*, 2011; Ye et Rape, 2009). La liaison est ensuite assurée par l'enzyme ubiquitine ligase E3 qui reconnaît spécifiquement le substrat à dégrader via des motifs spécifiques appelés dégrons (Ravid et Hochstrasser, 2008).

Pour que l'ubiquitine soit ajoutée sur le substrat, il doit y avoir liaison entre les enzymes E3, préalablement lié à son substrat, et E2. Cette liaison conduit au rapprochement de E2 et du substrat, ce qui permet le transfert de la molécule d'ubiquitine sur ce dernier (Metzger *et al.*, 2014). Il est à noter que la plupart des ubiquitine ligase E3 ne possèdent pas d'activité enzymatique contrairement à E2. Elles ne servent que d'intermédiaires dans la réaction afin de rapprocher physiquement l'enzyme de son substrat (Ozkan et Deisenhofer, 2005). La réaction peut se répéter plusieurs fois pour créer une chaîne de molécules d'ubiquitine sur le substrat qui pourra alors se détacher du complexe E3 (Thompson *et al.*, 2008).

En somme, dans le processus d'ubiquitination, seule la liaison de l'ubiquitine sur E1 nécessite de l'énergie. Les autres étapes de transfert sur E2 et sur le substrat ne sont que le résultat d'affinité et de proximité physique. Un schéma du processus global d'ubiquitination est présenté ci-dessous.

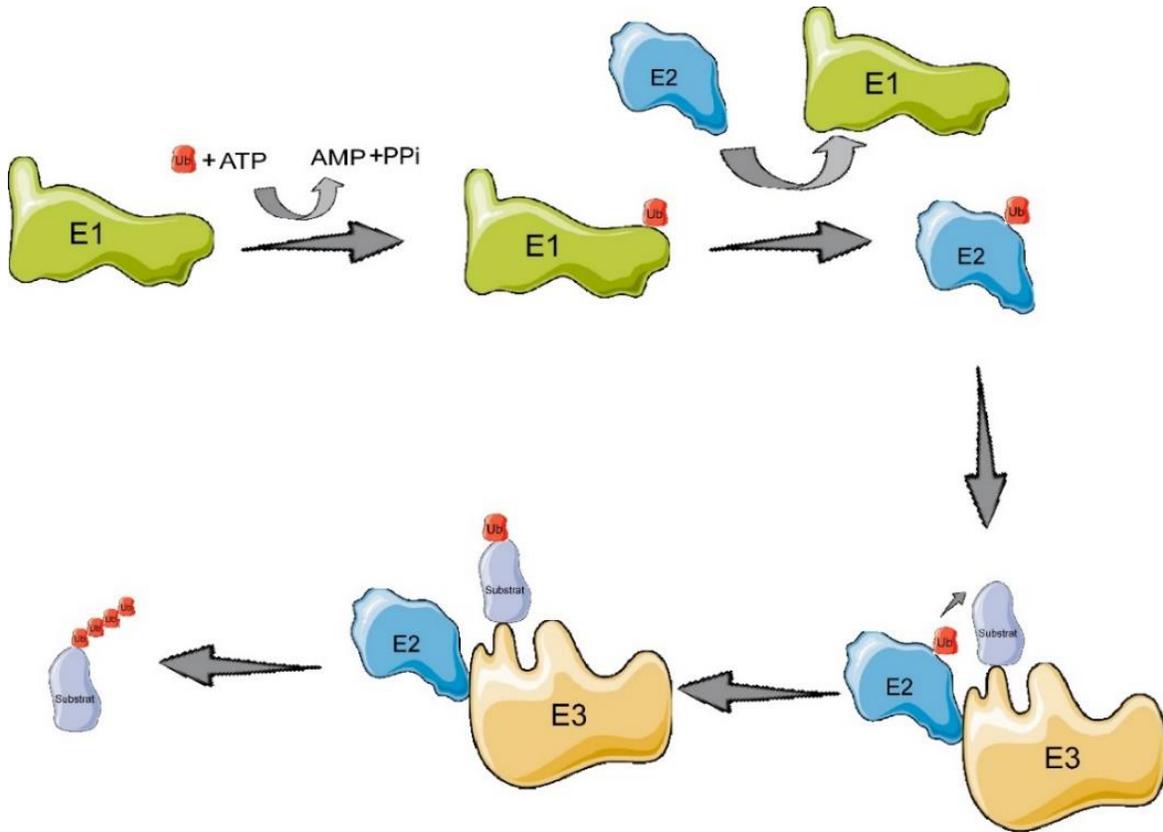


Figure 2 : **Conjugaison et transfert de molécules d'ubiquitine sur le substrat par les enzymes E1, E2 et E3.**¹

Une fois que le substrat poly-ubiquitiné se détache de E3, il sera perçu par la cellule comme un signal de dégradation (Thompson *et al.*, 2008). Il sera alors envoyé au protéasome, un complexe multiprotéique qui permet plusieurs types de réactions protéolytiques. Avant de dégrader les substrats, le protéasome doit utiliser de l'ATP comme source d'énergie pour détacher la chaîne d'ubiquitine du substrat et la séparer (Tanaka, 2009). Il pourra ensuite fragmenter la protéine en acides aminés grâce à des réactions d'hydrolyse catalysées par des protéases. Durant ces réactions, les molécules d'ubiquitine et les acides aminés seront alors relâchés du protéasome pour être recyclés (Poot *et al.*, 2017; Glickman et Ciechanover, 2002).

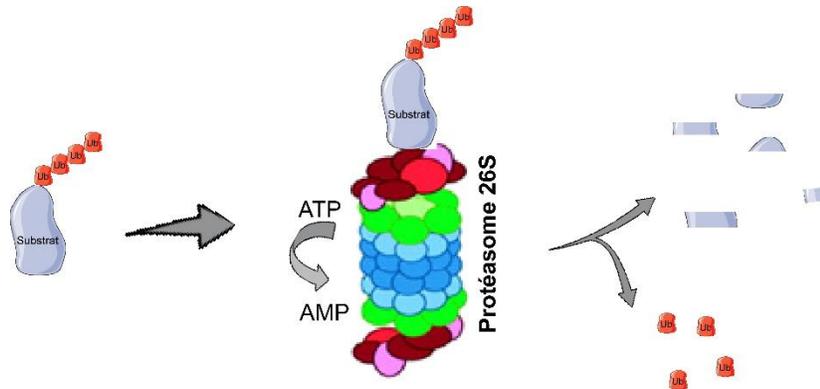


Figure 3 : **Dégradation des protéines en acides aminés par le protéasome (UPS) et recyclage de l'ubiquitine.**¹

1.3. Rôles de la dégradation

La protéolyse intracellulaire est un mécanisme rapide, spécifique et hautement régulé (Erhmann et Clausen, 2004). Elle soutient notamment les différentes étapes du cycle cellulaire, la transcription, la réplication de l'ADN, la transduction du signal dans plusieurs voies métaboliques et le développement (Petroski et Deshaies, 2005). Elle permet également de détruire les protéines qui sont non-fonctionnelles, tronquées, mal repliées ou trop nombreuses au sein de la cellule (Kleiger et Mayor, 2014). Tel que mentionné, la dégradation se veut également essentielle dans le processus de recyclage des acides aminés. Sans elle, les acides aminés ne seraient pas accessibles pour l'anabolisme d'autres protéines. Il deviendrait donc impossible pour l'organisme de répondre à ses besoins protéiques et les fonctions s'y rattachant s'en trouveraient compromises (Suraweera *et al.*, 2012).

1.4. Maladies causées par un défaut de la protéolyse

Des défauts dans le processus de dégradation des protéines peuvent mener à de graves maladies (Sakamoto, 2002). Parmi celles-ci, on retrouve plusieurs types de cancers. En outre, certains complexes ubiquitine ligase E3 sont impliqués dans la dégradation de suppresseurs tumoraux. Si l'ubiquitination est défectueuse, une dégradation excessive de ces suppresseurs peut donc survenir (Kitagawa *et al.*, 2009). La protéolyse intervient aussi dans la progression du cycle cellulaire par la dégradation ou la stabilisation de certaines protéines. L'arrêt de la progression du cycle par la stabilisation permet à la cellule de réparer son ADN dans le cas où il serait endommagé, et permet ainsi d'empêcher la réplication de cellules anormales (Bertoli *et al.*, 2015). Cependant, si la stabilisation des protéines responsables n'est pas faite correctement et que ces protéines sont dégradées, le cycle cellulaire se poursuivra sans permettre à la cellule de réparer son ADN et des cellules cancéreuses ou tumorales auraient le potentiel de se développer (Bashir et Pagano, 2003).

Plusieurs maladies neurodégénératives sont également causées par des problèmes du système ubiquitine-protéasome. Elles résultent souvent de l'accumulation de protéines mal repliées qui forment des plaques et nuisent au fonctionnement des cellules neuronales. On pense ici à la maladie d'Alzheimer, le Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la maladie d'Huntington (Hipp *et al.*, 2014) (Labbadia et Morimoto, 2015). Des mutations dans les gènes codant pour l'ubiquitine ligase peuvent aussi causer des malformations graves comme dans le Syndrome d'Angelman et la maladie de von Hippel-Lindau, où la dégradation d'une protéine oncogénique appelée facteur induit par l'hypoxie (HIF) est compromise (Greer *et al.*, 2011). L'accumulation de HIF cause plus particulièrement des carcinomes à cellules rénales claires (Ohh, 2006).

Une protéolyse trop efficace peut aussi mener à des maladies. C'est entre autres le cas de la fibrose kystique du pancréas dont le gène responsable, le canal *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), permet le transport des ions chlore à travers les membranes cellulaires (Rommens *et al.*, 1989; Cutting, 2015). Dans la plupart des cas, la protéine mutée a perdu un seul acide aminé, et malgré le fait qu'elle soit fonctionnelle, est reconnue par le réticulum endoplasmique comme étant anormale et envoyée au protéasome pour être détruite (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995). La dégradation excessive de CFTR conduit à l'augmentation de la viscosité du mucus ainsi que son accumulation dans les voies respiratoires, symptômes caractéristiques de la maladie (Cutting, 2015).

2. Ubiquitine

L'ubiquitine est une petite protéine retrouvée chez tous les organismes eucaryotes (Li et Ye, 2009). Elle est retrouvée dans toutes les cellules d'un organisme, d'où son nom (Groothuis *et al.*, 2006). Bien qu'elle possède plusieurs fonctions, l'ubiquitine est surtout impliquée dans la dégradation protéique par le protéasome (Sun et Chen, 2004). Sa liaison aux protéines constitue une modification de type post-traductionnelle (Song et Luo, 2019).

2.1. Historique

Des recherches réalisées dans les années 70 sur les systèmes protéolytiques ont permis de montrer que la dégradation des protéines nécessitait l'utilisation d'ATP (Etlinger et Goldberg, 1977; Hershko *et al.*, 1979). À cette époque, il était pourtant connu que la protéolyse libérait de l'énergie plutôt qu'elle n'en consommait. Afin d'élucider cette contradiction, des scientifiques israéliens se sont penchés sur la question. Ils ont ainsi découvert le processus d'étiquetage des protéines comme signal de dégradation par un polypeptide appelé APF-1 (*ATP-dependent proteolytic factor*) aujourd'hui connu sous le nom d'ubiquitine (Hershko *et al.*, 1980; Ciechnover *et al.*, 1980). Cette découverte leur a également permis de mettre en lumière les processus d'ubiquitination, laquelle se fait via les enzymes E1, E2 et E3, et de dégradation des protéines par le protéasome.

2.2. Structure

L'ubiquitine est une protéine de 8,5 kDa qui est constituée de 76 acides aminés. Sa structure est composée de cinq feuillets bêta, d'une hélice alpha et d'une courte hélice de type 3_{10} (Vijay-Kumer, *et al.*, 1987; Pickart et Eddins, 2004; Kiel et Serrano, 2006). Elle possède un résidu glycine en C-terminal qui lui permet de se lier à E1. Elle peut également se lier de manière covalente à des protéines cibles via des résidus lysine (Hershko *et al.*, 1983). Les différents ponts hydrogène qu'elle peut ainsi former lui permettent de se lier à une multitude de substrats différents (Cierpicki *et al.*, 2002).

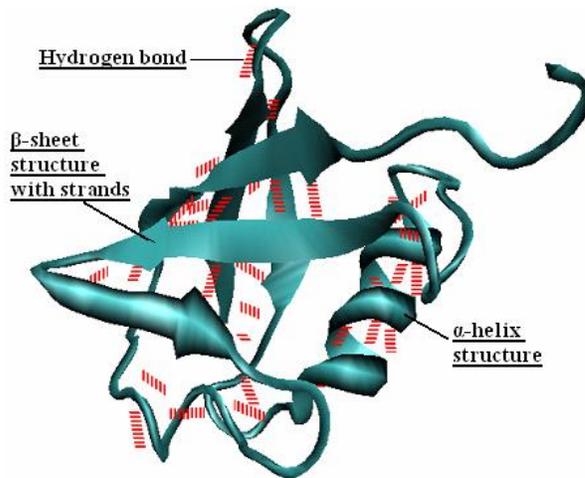


Figure 4 : Structure 3D de l'ubiquitine incluant les ponts hydrogènes, l'hélice alpha et les feuillets bêta (Banu *et al.*, 2011).

La séquence peptidique de l'ubiquitine comporte sept résidus lysine qui lui permettent aussi de former des chaînes avec d'autres molécules d'ubiquitine. Ces chaînes peuvent être plus ou moins longues et peuvent avoir une rigidité et des conformations différentes qui conduiront à des finalités variées (Weissman *et al.*, 2001; Pickart, 2000). Elles doivent compter au moins quatre molécules d'ubiquitine pour être reconnues spécifiquement pour la dégradation par le protéasome (Peng *et al.*, 2003).

2.3. Conservation entre les espèces

L'ubiquitine est une protéine hautement conservée parmi les espèces; la protéine humaine ne diffère que par 3 acides aminés avec celle retrouvée chez la plante et celle retrouvée chez la levure (Figure 5). Les voies de dégradation dépendantes de l'ubiquitine sont également très conservées, et ce, parmi plusieurs règnes différents (Patton *et al.*, 1998). Tel qu'illustré ci-dessous, on peut voir un alignement de séquences provenant des règnes animal, végétal et des fungi.

H. sapiens	MQIFVKTLTGKTITLEVEFSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLGG
M. musculus	mqifvktltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrllifagkqledgrtllsdyniqkestlhlvlrlrgg
O. mykiss	mqifvktltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrllifagkqledgrtllsdyniqkestlhlvlrlrgg
X. laevis	mqifvktltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrllifagkqledgrtllsdyniqkestlhlvlrlrgg
S. cerevisiae	mqifvktltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrllifagkqledgrtllsdyniqkestlhlvlrlrgg
A. thaliana	mqifvktltgkttilevepsdtienvkakiqdkegippdqqrllifagkqledgrtladyyniqkestlhlvlrlrgg

Figure 5 : **Séquences en acides aminés de l'ubiquitine chez différentes espèces.** En ordre, du haut vers le bas : l'humain, la souris, le saumon, la grenouille, la levure et l'arabette des dames. Les résidus encadrés en rouge sont ceux qui diffèrent entre les 6 espèces. *H.sapiens* = *Homo sapiens*, *M.musculus* = *Mus musculus*, *O.mykiss* = *Oncorhynchus mykiss*, *X.laevis* = *Xenopus laevis*, *S.cerevisiae* = *Saccharomyces cerevisiae* et *A.thaliana* = *Arabidopsis thaliana*.

2.4. Rôles

L'ubiquitine joue d'autres rôles que celui de soutenir la protéolyse. Parmi ces rôles, on compte la présentation antigénique, l'apoptose, la biogenèse des organelles et des ribosomes, le cycle cellulaire, la division cellulaire, l'endocytose, la réparation et la transcription de l'ADN, la différenciation cellulaire, le développement, la réaction immunitaire et l'inflammation, la morphogenèse des circuits neuronaux, la modulation des récepteurs de surface, des canaux ioniques et des voies sécrétoires, les réponses au stress et les infections virales (Hershko et Ciechanover, 1992; Oshumi, 2001; Katzmann *et al.*, 2002; Schnell et Hicke, 2003; Aguilar et Wendland, 2003; Muratani et Tansey, 2003; Haglund et Dikic, 2005; Huang et d'Andrea, 2006; Mukhopadhyay et Riezman, 2007; Kirkin et Dikic, 2007).

2.5. Processus d'ubiquitination

Tel que mentionné plus tôt, l'ubiquitine est une composante essentielle du système UPS. Sa liaison aux substrats est catalysée par les enzymes E1, E2 et E3 et son recyclage est assuré par le protéasome (Cadwell et Coscoy, 2005). La figure ci-dessous présente un résumé du cycle d'ubiquitination et de dégradation des protéines expliqué à la section 1.1.2.

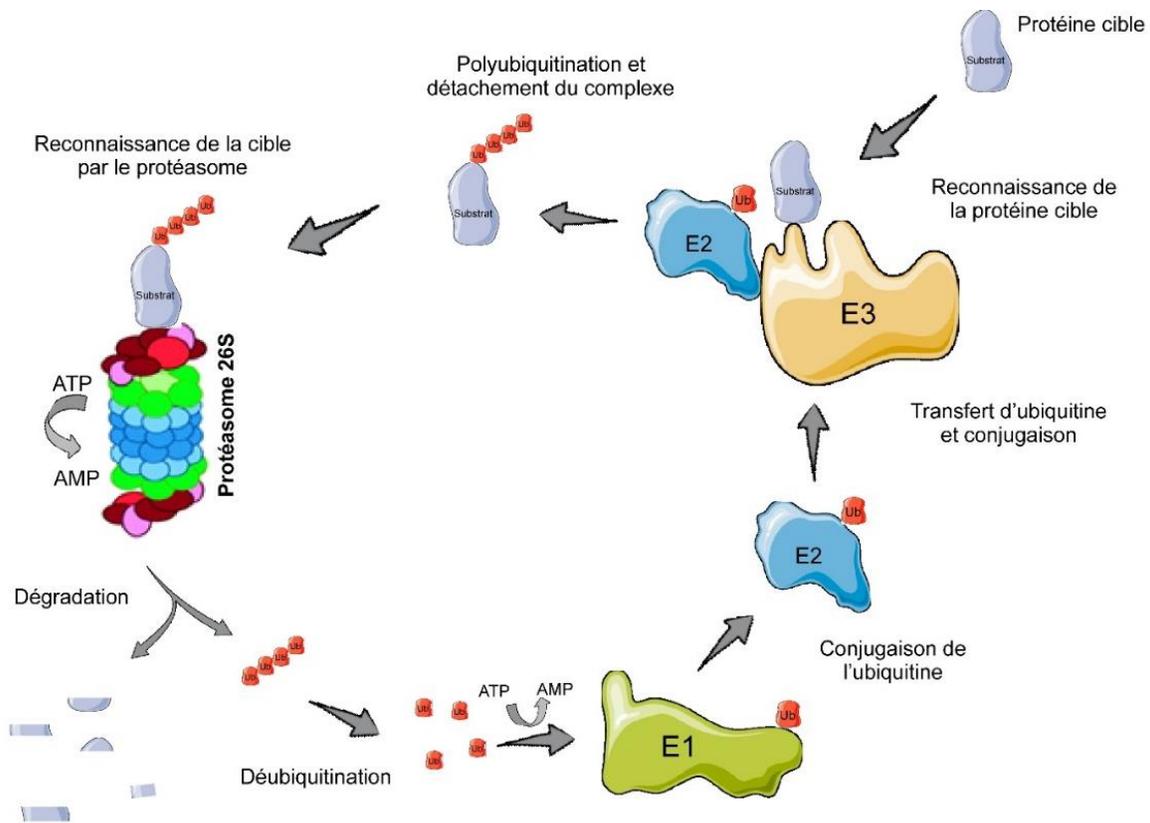


Figure 6 : **Système ubiquitine-protéasome (UPS) : Mécanisme global d'ubiquitination des protéines et de dégradation par le protéasome.**¹

2.6. Protéines apparentées à l'ubiquitine

Plusieurs protéines possèdent une structure semblable à celle de l'ubiquitine, elles sont appelées protéines apparentées à l'ubiquitine ou encore *ubiquitin-like*. Malgré une structure semblable, leurs propriétés biochimiques et leurs fonctions n'en diffèrent pas moins (Jentsch et Pyrowolakis, 2000; Schwartz et Hochstrasser, 2003; Welchman *et al.*, 2005). Parmi ces protéines *ubiquitin-like*, on retrouve NEDD8 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein8*) qui permet l'activation du complexe ubiquitine ligase E3 et dont le rôle sera discuté en détails plus loin.

3. Les complexes ubiquitine-ligase E3

Les complexes ubiquitine-ligase sont multimériques et, rappelons-le, permettent de transférer une molécule d'ubiquitine sur les substrats en association avec l'enzyme conjuguée à l'ubiquitine E2 (Hershko *et al.*, 1983). Il en existe deux catégories : ceux de type HECT et ceux de type RING-finger (Metzger *et al.*, 2012).

3.1. Les complexes HECT

Les complexes E3 de type HECT (*Homologous to E6AP carboxy terminus*) possèdent un rôle quantitativement moins important dans le système UPS comparativement à ceux de type RING-finger (Metzger *et al.*, 2012). Les complexes HECT se distinguent principalement par leur activité enzymatique intrinsèque. Une cystéine présente l'un de leurs domaines, domaine qui s'appelle aussi HECT, permet de former un lien thio-ester avec l'ubiquitine afin de transférer cette dernière sur le substrat (Huibregtse *et al.*, 1995). Même si l'ubiquitine E2 est activée par les complexes E3, elle n'est pas nécessaire au transfert de l'ubiquitine sur le substrat (Weber *et al.*, 2019).

3.2. Les complexes RING-finger

Les complexes RING-finger (*Really Interesting New Gene*) sont les complexes majoritairement responsables de l'UPS (Deshaies et Joazeiro, 2009). Ils ne possèdent pas de cystéine catalytique comme c'est le cas pour les complexes HECT. Ils n'ont donc aucune activité enzymatique intrinsèque. C'est pourquoi ils ont besoin de l'enzyme E2 pour permettre l'ubiquitination (Metzger *et al.*, 2014). Ils sont divisés en deux sous-catégories : les CRL (*Cullin-RING-E3-ligases*) et les APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*). Les APC/C ne seront pas discutés dans le présent mémoire faute de pertinence pour le sujet de recherche.

3.2.1. Complexes CRL

Les complexes CRL sont les principaux acteurs impliqués dans l'UPS (Deshaies et Joazeiro, 2009). Tout d'abord, ils permettent la reconnaissance spécifique du substrat et, ensuite, l'ubiquitination pour une dégradation subséquente au protéasome.

3.2.1.1. Structure

Malgré qu'il existe plusieurs familles de complexes CRL avec des rôles différents, tous ont une structure similaire avec des domaines communs : le domaine RING, la culline et le module adaptateur de substrat (Willems *et al.*, 2004).

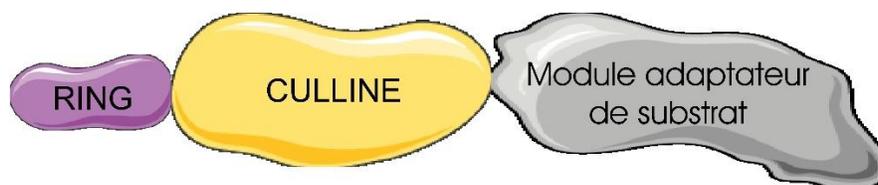


Figure 7 : Configuration générale des complexes SCF/CRL.¹

Le module adaptateur de substrat est très variable entre les différentes familles de complexes CRL et peut être composé d'une ou de deux protéines différentes. C'est cette partie du complexe qui est

responsable de la reconnaissance du substrat (Ravid et Hochstrasser, 2008). Les différentes familles de protéines CRL sont présentées dans le tableau ci-dessous.

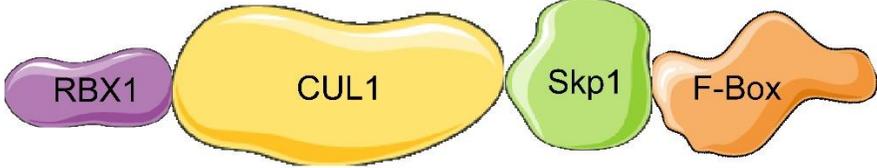
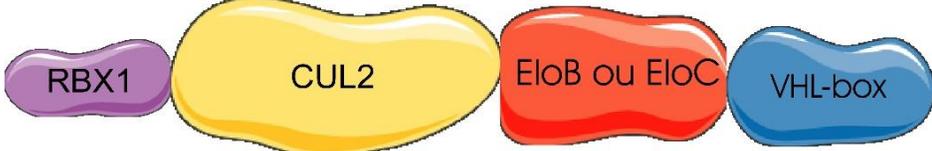
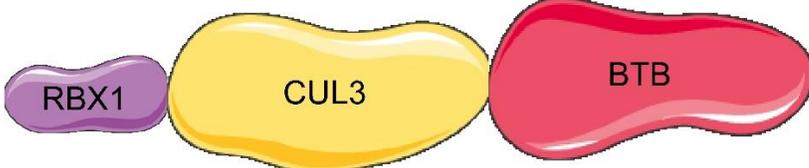
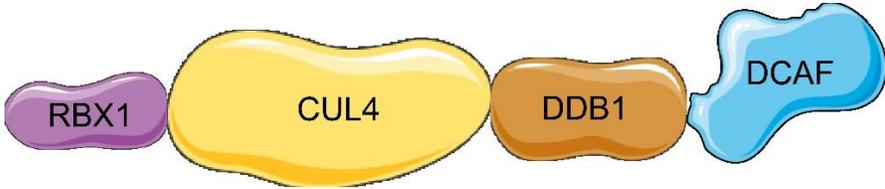
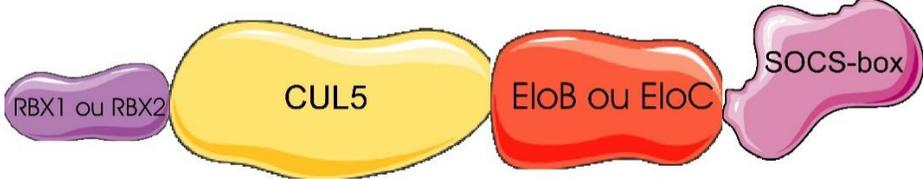
Famille	Schéma
SCF/CRL1	
CRL2	
CRL3	
CRL4	
CRL5	

Tableau 1 : Schéma des différents complexes de type RING-finger.¹

Chacune des cinq familles de CRL possède une protéine R-box (RBX) qui sert de domaine RING. Pour les CRL1 à 4, il s'agit de la même protéine, soit RBX1. Dans le cas des CRL5, il peut soit s'agir de RBX1 ou RBX2.

En ce qui a trait à la culline, elle est différente pour toutes les familles. Ainsi, Cul1 est la culline des SCF/CRL1, Cul2 est celle des CRL2, Cul3 est celle des CRL3, Cul4 est celle des CRL4 et finalement Cul5 est celle des CRL5 (Bosu et Kipreos, 2008).

Le module adaptateur de substrat peut être constitué d'une ou deux protéines. Il contient toujours deux parties cependant. La première est appelée protéine adaptatrice et permet la liaison à la culline. La deuxième partie du module est appelée adaptateur de substrat et permet justement le recrutement de substrats (Bulatov et Ciulli, 2015). Si on se réfère au tableau 1, la protéine adaptatrice peut être soit Skp1, Elongin B ou C, ou encore DDB1 tout dépendant du type de CRL. Pour ce qui est de l'adaptateur de substrat, il peut être soit une protéine contenant un domaine F-box, VHL-box ou SOCS-box ou la protéine DCAF (Lydheard *et al.*, 2013). Pour la famille des CRL3, dont le module adaptateur de substrat n'est composé que d'une seule protéine, cette dernière assure les deux rôles. En effet, les protéines contenant un domaine BTB peuvent à la fois interagir avec la culline et reconnaître le substrat (Bosu et Kipreos, 2008). Il existe plusieurs sous-types d'adaptateurs de substrat (voir tableau 2), permettant à chacun des complexes d'être assez spécifique (Petroski et Deshaies, 2005; Lee et Zhou, 2007).

Type d'adaptateur de substrat	Nombre d'adaptateurs potentiels
F-box	109
VHL-box ou SOCS-box	51
BTB	439
DCAF	60
Total	659

Tableau 2 : **Nombre d'adaptateurs de substrats estimé chez l'humain**

En considérant les différentes combinaisons possibles de protéines adaptatrices et d'adaptateurs de substrats, le nombre de substrats pouvant être ubiquitinés par ces complexes de manière assez spécifique est nécessairement très élevé. On estime aussi qu'il pourrait y avoir plus de 600 enzymes E3 encodées par le génome humain (Clague *et al.*, 2015). Dans le cadre de ce mémoire, nous nous attarderons au complexe de la famille SCF/CRL1.

4. Complexes SCF/CRL1

4.1. Historique

Les complexes SCF/CRL1 furent découverts en 1999 par Raymond J.Deshaies grâce à des études génétiques du cycle cellulaire chez *S.cerevisiae*. Ce chercheur a été capable de montrer que le complexe pouvait médier la transition entre les phases G1 et S du cycle cellulaire chez la levure (Deshaies, 1999).

4.2. Structure

Tel que mentionné, les complexes SCF/CRL1 sont formés de cinq protéines : l'enzyme conjuguée à l'ubiquitine E2, *RING-box protein 1* (Rbx1), Cullin1 (Cul1), *S-phase kinase associated protein 1* (Skp1) et une protéine contenant un domaine F-box (Pagano et Cenciarelli 1999; Jin *et al.*, 2004). Le nom du complexe SCF lui provient d'ailleurs de ses composantes Skp1, Cul1 et F-box.

À l'extrémité du complexe se trouve E2 qui se lie au domaine RING-finger de RBX1. Cul1, quant à elle, se lie à RBX1 via son extrémité C-terminale et à Skp1 via son extrémité N-terminale. La liaison de Skp1 à la protéine F-box se fait grâce au domaine F-box plus spécifiquement (Bai *et al.*, 1996). Finalement, les substrats du complexe SCF/CRL1 se lient aux domaines WD40 de la protéine F-box (Deshaies, 1999).

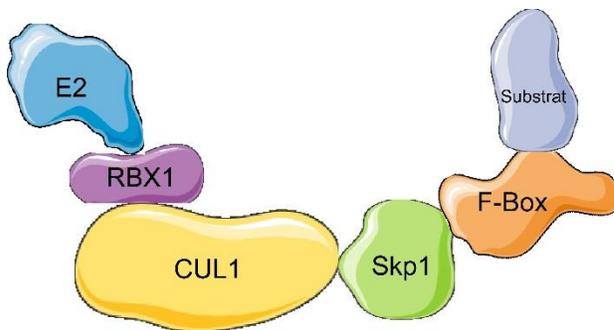


Figure 8 : **Structure du complexe SCF/CRL1.**¹

4.2.1. Enzyme conjuguée à l'ubiquitine E2

L'enzyme conjuguée à l'ubiquitine E2 constitue la partie enzymatique du complexe SCF. Lorsque E2 et l'ubiquitine sont liées, il y a liaison au reste du complexe ubiquitine ligase E3 ce qui entraîne le transfert de l'ubiquitine sur un résidu lysine du substrat (Metzger *et al.*, 2014). Cependant, pour permettre l'ubiquitination, la liaison thio-ester, qui lie l'ubiquitine à E2, doit être suffisamment proche de la lysine du substrat à dégrader (Ozkan et Deisenhofer, 2005).

4.2.2. RING-box protein 1 (RBX1)

RBX1 est une protéine composée de 108 acides aminés (Wei et Sun, 2010). Elle est formée de feuilletés β qui lui permettent d'interagir avec Cul1. Lorsque le complexe n'est pas activé, le domaine RING de RBX1 est enfoui et inaccessible pour la liaison à E2 (Zheng *et al.*, 2002). Le domaine RING de RBX1 doit donc être disponible pour permettre à E2 de s'y accrocher, ce qui aura aussi pour effet de rapprocher E2 du substrat. C'est la liaison de NEDD8 (*neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein8*) à la culline qui rend le domaine RING accessible, et ce, grâce à un changement de conformation (Saha et Deshaies, 2008; Saifee et Zheng, 2008; Duda *et al.*, 2008). Le complexe est alors activé ce qui permet le recrutement de l'enzyme E2 via le domaine

RING finger de RBX1 (Spratt *et al.*, 2012). Un modèle de l'activation du complexe est présenté à la section 4.4.1.

4.2.3. Cullin1 (Cul1)

Cul1 est une protéine d'échafaudage de 776 acides aminés qui permet l'assemblage du complexe SCF (Yamoah *et al.*, 2008). Via son domaine C-terminal, Cul1 se lie à RBX1 pour former le cœur du complexe (Deshaies, 1999). Elle se lie à Skp1 via son extrémité N-terminale (Wu *et al.*, 2000).

4.2.4. S-phase kinase associated protein 1 (Skp1)

Skp1 est une protéine ubiquitaire de 160 acides aminés que l'on retrouve à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Gstaiger *et al.*, 1999). Au sein du complexe SCF, rappelons qu'elle occupe une fonction de protéine adaptatrice : elle est essentielle pour l'assemblage du complexe ainsi que son activité (Bulatov et Ciulli, 2015). Elle a la capacité de lier différentes protéines F-box, ce qui permet de donner une grande spécificité à un complexe SCF donné. Au sein de ce complexe, elle interagit avec le domaine N-terminal de Cul1 grâce à son domaine BTB (*bric-à-bras, tramtrack and broad complex*) et avec le domaine F-box de la protéine F-box via son domaine C-terminal. Elle fait également le lien entre le cœur du complexe (Cul1 et RBX1) et la partie réceptrice du complexe (F-box) (Schulman *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2002).

4.2.5. Protéine F-box

Tel que mentionné, les protéines F-box correspondent à une grande famille de protéines qui compte approximativement 70 membres chez l'humain (Jin *et al.*, 2004). Elles sont formées d'un domaine F-box et souvent de domaines WD40 permettant l'interaction avec d'autres protéines.

4.2.5.1. Domaine F-box

Les domaines F-box des protéines F-box comprennent de 40 à 50 acides aminés. Ils doivent ce nom à la première protéine chez qui ce domaine fut identifié, soit la cycline F. C'est un domaine conservé au travers de l'évolution. Il permet la liaison au complexe SCF via Skp1 (Kipreos et Pagano, 2000).

4.2.5.2. Domaine WD40

Les domaines WD40 sont formés par 40 acides aminés dont un tryptophane (W) et un acide aspartique (D) à la fin du domaine, ce qui explique leur nom (Zhang et Zhang, 2015). Ils permettent des interactions très spécifiques avec le substrat. C'est pourquoi la protéine F-box, qui contient souvent des domaines WD40, procure la spécificité au complexe (Xu et Min, 2011). Les domaines WD40 sont constitués de 3 hélices alpha. Ils sont très peu conservés (Li and Roberts, 2001; Smith *et al.*, 1999). Le nombre de domaines WD40 varie d'une protéine F-box à l'autre.

4.3. Substrats des complexes SCF

Parmi les substrats dégradés par les complexes SCF, on retrouve des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire comme I κ Ba et p27 (Read *et al.*, 2000; Podust *et al.*, 2000) (Morimoto *et al.*, 2000). D'autres études ont aussi montré que la famille des F-box/WD40 était responsable de la dégradation de protéines cibles impliquées dans les voies Wnt, Hh (hedgehog) et Nf-kB (Chen et Chen, 2015; Hsia *et al.*, 2015; Tauriello et Maurice, 2010). En effet, des protéines F-box ont été associées à la dégradation de substrats comme Cubitus interruptus, I κ Ba et β -caténine qui sont tous des membres des voies Hedgehog, NF-kb et Wnt. De façon intéressante, ces voies sont impliquées dans le développement normal des membres.

4.4. Régulation du complexe SCF

4.4.1. Activation du complexe

L'activation du complexe passe par la linéarisation du domaine RING de RBX1 pour permettre le recrutement de E2. Pour ce faire, un changement de conformation doit avoir lieu puisque le domaine RING est enfoui au sein du complexe et est inaccessible. La liaison de la protéine apparentée à l'ubiquitine NEDD8 sur la lysine 720 de Cul1 entraîne ce changement de conformation permettant à E2 d'accéder au domaine RING. Le changement de conformation induit par la liaison de NEDD8 favorise également le transfert de l'ubiquitine de E2 vers la cible en plus de rendre le site de liaison de CAND1, un inhibiteur du complexe, inaccessible (Saha et Deshaies, 2008; Saifee et Zheng, 2008; Duda *et al.*, 2008).

4.4.1.1. NEDD8

NEDD8 (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8*) est une protéine de 8 kDa apparentée à l'ubiquitine qui se lie à l'extrémité C-terminal de Cul1 (Whitby *et al.*, 1998). La conjugaison de NEDD8 sur la culline, appelée neddylation, s'effectue grâce à trois enzymes (appelées E1, E2 et E3) qui sont spécifiques à NEDD8. Malgré un processus de liaison semblable à l'ubiquitination, les enzymes E1, E2 et E3 utilisées pour la liaison de NEDD8 sur le complexe sont différentes (Pan *et al.*, 2004).

4.4.1.2. Processus de neddylation

La liaison de la protéine NEDD8 à ses substrats est covalente et se fait à la Lys720 de Cul1 lorsque celle-ci forme un complexe dimérique avec RBX1 (Pan *et al.*, 2004). Dans ce complexe, NEDD8 induit un changement de conformation qui permet Cul1-RBX1 de lier Skp1-F-box afin de former un tétramère (Pierce *et al.*, 2013). Le recrutement de E2 sur RBX1 est alors possible dû à la libération du domaine RING. Il est important de noter que la liaison de NEDD8 à Cul1 modifie seulement l'extrémité C-terminale de RBX1. Cette liaison n'interfère pas avec celle de Cul1 et Skp1-FBXW4 en N-terminal (Pierce *et al.*, 2013).

L'effet de la neddylation sur l'activité du complexe SCF a été bien étudié. En outre, on sait que les complexes neddylés ont une activité beaucoup plus importante que les complexes non neddylés *in vitro* (Wu *et al.*, 2000). De plus, les complexes SCF neddylés recrutent de manière plus efficace l'enzyme E2 activée, stimulent le transfert de la première molécule d'ubiquitine et la poly-ubiquitination et permettent l'action répétée du complexe avec plusieurs substrats (Saha et Deshaies, 2008).

Une expérience a également été faite pour étudier l'effet de la neddylation sur le rapprochement de la E2 et du substrat dans le complexe SCF/ β -TrCP, β -TrCP étant une protéine qui contient un domaine F-box. Avec des agents chimiques de pontage qui permettent la liaison covalente entre deux protéines voisines, ils ont montré que la neddylation rapprochait bel et bien E2 des substrats. L'équipe a aussi noté que cette liaison ne se formait que s'il y avait neddylation, confirmant par le fait même le changement de conformation induit par la liaison de NEDD8 sur la culline (Saha et Deshaies, 2008). Des études cristallographiques ont par ailleurs montré que la neddylation induisait un changement de conformation dans la région C-terminale de la culline à l'intérieur du complexe Cul5^{Ctd}/RBX1 et permettait l'accessibilité du domaine RING de RBX1 pour la liaison avec E2. Ces recherches ont aussi montré que le domaine C-terminal de la Cul1 possède une activité inhibitrice qui est neutralisée par la liaison avec NEDD8 (Duda *et al.*, 2008). L'équipe en est donc venue à la conclusion que le domaine C-terminal de la culline est auto-inhibiteur. Cette inhibition peut être contrée par la liaison de NEDD8 sur la culline ce qui favorise le repositionnement de la E2 près des résidus lysine des substrats à ubiquitiner.

4.4.2. Inhibition du complexe SCF

L'inhibition du complexe SCF passe par le blocage de son activation. En effet, une protéine appelée CAND1 empêche l'assemblage du complexe en inhibant le processus de neddylation de Cul1. Elle empêche également l'activité ligase de E2, c'est-à-dire qu'elle bloque le transfert des molécules d'ubiquitine sur le substrat (Goldenberg *et al.*, 2004).

4.4.2.1. CAND1

La protéine CAND1 inhibe plus spécifiquement le complexe SCF en se liant à Cul1 lorsque celle-ci n'est pas neddylée, ce qui empêche sa liaison à Skp1, et inhibe également la liaison de NEDD8 à Cul1. À l'inverse, CAND1 ne peut lier Cul1 si celle-ci est neddylée (Goldenberg *et al.*, 2004). En effet, la neddylation de Cul1 atténue l'effet de CAND1 de 30 000 fois (Pierce *et al.*, 2013).

Il a été montré *in vitro* que l'activité inhibitrice de CAND1 s'effectue en empêchant l'assemblage du complexe ainsi que sa neddylation. (Duda *et al.*, 2012). Cependant, l'ajout du complexe F-box-Skp1 permet de retirer CAND1 de Cul1 rapidement. CAND1 peut également retirer plusieurs F-box de Cul1 (Pierce *et al.*, 2013). De cette manière, le pool de F-box-Skp1 pouvant se lier au complexe Cul1-Rbx1 est équilibré.

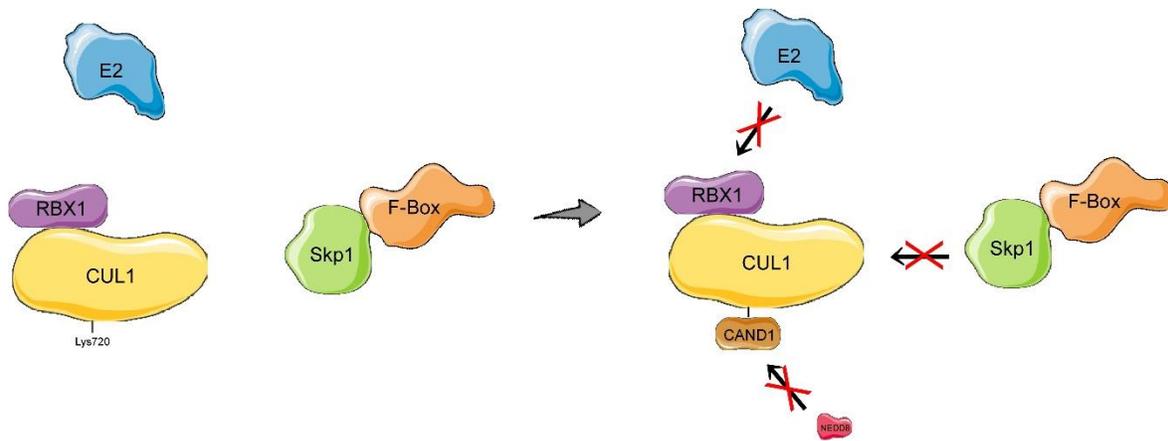


Figure 9 : Inhibition de l'assemblage du complexe SCF par CAND1.¹

4.4.2.2. Signalosome COP9

Le signalosome COP9 catalyse la réaction inverse de neddylation, c'est-à-dire qu'il brise la liaison de NEDD8 à la culline en plus d'inactiver le complexe SCF (Schmaler et Dubiel, 2010). Il est essentiel pour l'action des ubiquitines ligases. En effet, l'inactivation du complexe empêche une dégradation excessive des protéines dans la cellule (Richardson et Zundel, 2005). Lorsque COP9 est actif, NEDD8 n'est pas lié à la Cul1 et le complexe SCF est inactif. Lorsque COP9 est inactif, les modules adaptateurs de substrats, c'est-à-dire le dimère Skp1-F-box, sont dégradés par un mécanisme autocatalytique (Cope et Deshaies, 2003). Il a également été montré que la protéine F-box permet de stabiliser le signalosome COP9 à titre de mécanisme autorégulateur (Enchev *et al.*, 2012).

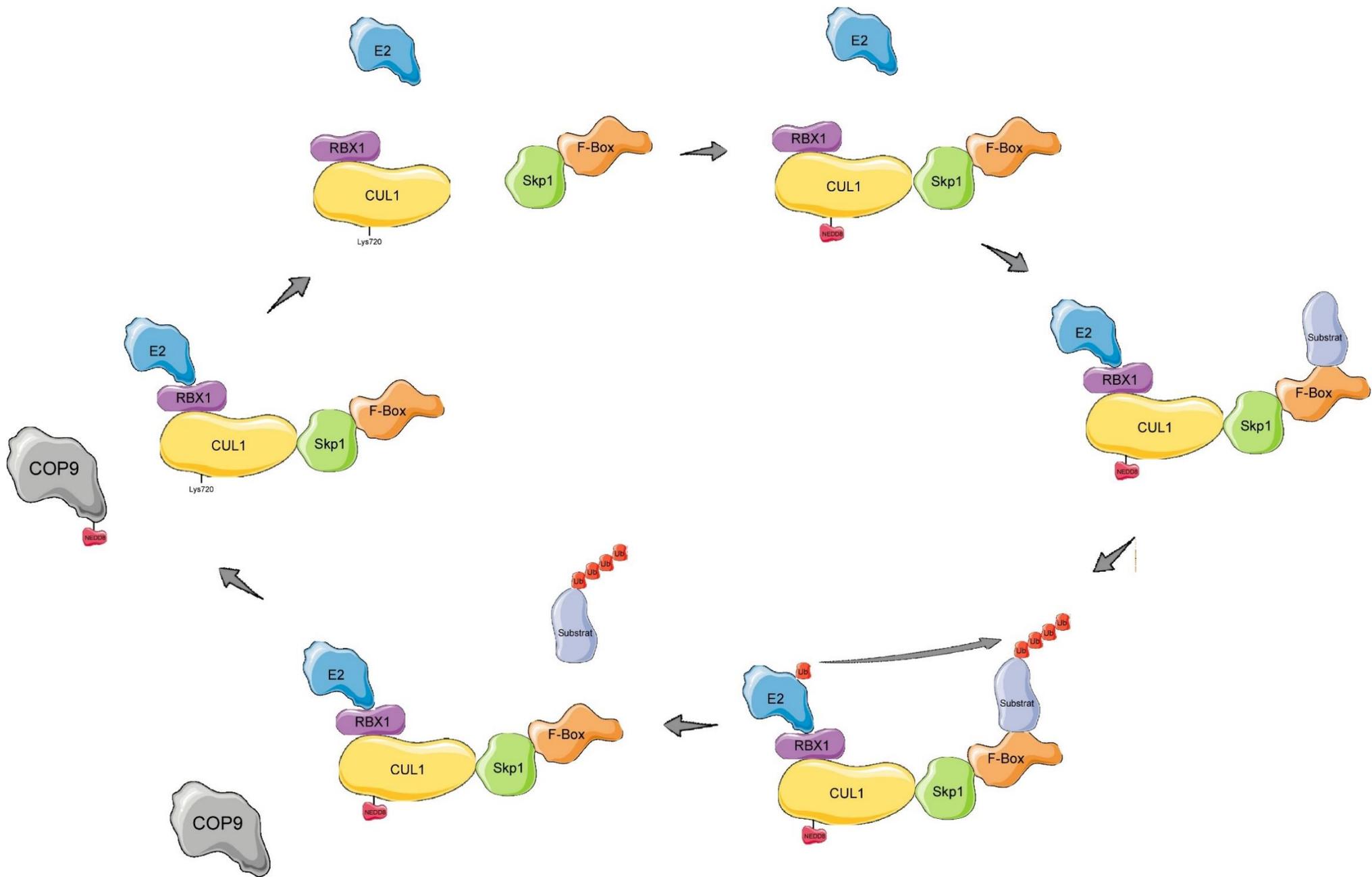


Figure 10 : Activation du complexe SCF par la protéine NEDD8 et inactivation par le signalosome COP9.¹

4.4.3. Dimérisation des complexes SCF

La dimérisation des complexes SCF permet de stimuler l'ubiquitination. Plusieurs protéines de la famille des F-box, soit FBXW7 et FBX4, dimérisent via leur module de reconnaissance du substrat c'est-à-dire le domaine F-Box (Hao *et al.*, 2007; Welcker et Clurman, 2007; Barbash *et al.*, 2008). FBXW7 dimérise grâce à un motif se trouvant avant la F-box à son extrémité N-terminale. La mutation des résidus 252, 253, 256 et 257, lesquels se trouvent avant le début de la F-box en position 278, empêche la co-immunoprécipitation indiquant que le domaine de dimérisation, appelé domaine D, se trouverait dans cette région (Hao *et al.*, 2007). D'après Welcker et Clerman, le domaine de dimérisation de FBXW7 se trouverait avant la F-box, soit entre les résidus 67 et 90 après la fin de l'exon 1 et inclurait les résidus leucine, isoleucine, sérine et proline. Les mutants du domaine D diminuent aussi l'ubiquitination de la cycline E, qui est le substrat du complexe SCF/FBXW7. La dimérisation est donc importante pour l'activité du complexe (Hao *et al.*, 2007; Welcker et Clurman, 2007).

Certaines protéines F-box dont le module de reconnaissance des substrats est inactivé par des mutations sont capables de dimériser et d'agir comme des dominants négatifs. Elles perdent donc leur fonction d'ubiquitination et empêchent la dégradation des substrats *in vivo* (Pintard *et al.*, 2003). Une observation intéressante a montré qu'une protéine F-box retrouvée chez *Saccharomyces cerevisiae* (Cdc4) qui porte une mutation à la fois dans le module de reconnaissance et le domaine D perdait son effet dominant négatif (Dixon *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2007). Cette protéine double mutante n'empêche pas les protéines sauvages de fonctionner contrairement à des protéines Cdc4 dont seul le domaine D est muté, indiquant l'importance de la dimérisation sur l'action du complexe. Le fait de rétablir artificiellement la dimérisation permet aussi de restaurer leur fonction (Tang *et al.*, 2007). Toutefois, il a été montré que pour le complexe SCF/Cdc4, la dimérisation n'augmente pas l'affinité pour les substrats mais permet d'en faciliter l'accès.

Il est également à noter que la dimérisation est favorable pour la diversité géométrique des chaînes d'ubiquitine. Les complexes dimérisés, puisqu'ils comportent deux enzymes E2, favorisent la polyubiquitination des substrats en plus de positionner les molécules d'ubiquitine dans des angles différents pour leur donner une géométrie unique. La géométrie de la chaîne d'ubiquitine est cruciale pour la reconnaissance du substrat par le protéasome (Tang *et al.*, 2007).

Il existe un très grand nombre de protéines F-box chez l'humain chacune ayant des processus de régulation qui lui sont propres. Étant donné la multitude de protéines existantes, cependant, beaucoup de ces systèmes de régulation ne sont pas encore élucidés. C'est le cas de la protéine FBXW4.

5. La protéine F-box/WD repeat-containing protein 4 (FBXW4)

La *F-box/WD repeat-containing protein 4* (FBXW4) est une protéine qui fait partie de la famille des F-box. Elle est encodée par le gène FBXW4 situé sur le locus 10q24. En plus de son domaine F-box, cette protéine possède également six domaines WD40 qui lui permettent de faire des interactions protéine-protéine avec différents substrats (Ivanakiev *et al.*, 1999). Le fait que FBXW4 possède un domaine F-box laisse suggérer qu'elle ferait partie du complexe SCF et qu'elle y jouerait un rôle d'adaptateur de substrat en liant différentes protéines.

5.1. Structure

FBXW4 est une protéine de 412 acides aminés avec un poids moléculaire de 46,3 kDa (Ivanakiev *et al.*, 1999). Elle contient un domaine F-box du côté N-terminal et six domaines WD40 situés du côté C-terminal. Le domaine F-box est constitué par les acides aminés 25 à 71 alors que les domaines WD40 sont constitués par les acides aminés 154 à 190, 193 à 229, 236 à 277, 283 à 321, 327 à 366 et 373 à 409 (Lockwood *et al.*, 2013). La protéine a été retrouvée dans des organes tels que le rein, le cœur, les poumons, le cerveau, le foie, la rate et la vessie (Genecards).

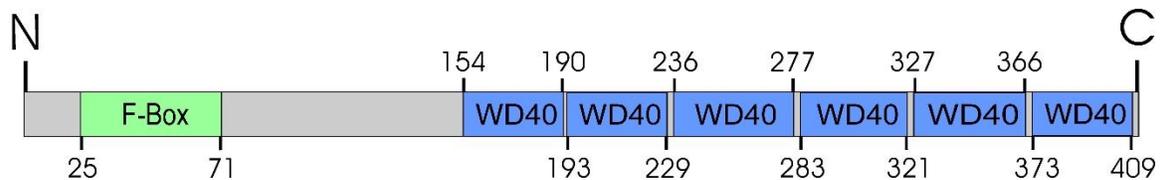


Figure 11 : Structure de la protéine FBXW4 et position des domaines F-box et WD40

5.2. Interactome

Afin de connaître l'interactome de FBXW4, l'équipe de Lockwood et Beverly a fait des expériences de spectrométrie de masse. Ils ont trouvé que les composantes du complexes SCF, soit Skp1, Cul1 et RBX1, ainsi qu'un des régulateurs du complexe, soit le signalosome COP9, interagissaient avec FBXW4. Ils ont également découvert que FBXW4 pouvait interagir avec des protéines ubiquitinées. Les expériences que Lockwood et Beverly ont réalisées ont montré l'importance du domaine F-box pour la liaison de FBXW4 à des protéines ubiquitinées. En effet, après avoir créé une protéine sans domaine F-box, ils ont remarqué que FBXW4 était incapable de lier les protéines ubiquitinées, confirmant une fois de plus que la F-box est nécessaire pour la liaison aux substrats (Lockwood *et al.*, 2013). Tous ces éléments laissent supposer que FBXW4 serait bel et bien une composante du complexe SCF.

On croit que FBXW4 serait responsable de la dégradation de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire ou encore la survie cellulaire. Cependant, il s'agit encore que d'une

hypothèse et des recherches plus approfondies doivent être réalisées (Lockwood *et al.*, 2013). L'identité de potentiels substrats reste aussi inconnue à ce jour.

5.3. Rôles

Les rôles de FBXW4 chez l'humain sont encore mal définis. Cependant, plusieurs recherches ont permis d'émettre quelques hypothèses. Il a été découvert que la survie de patients atteints de cancer était diminuée chez ceux exprimant des taux plus bas de FBXW4. Cette observation indiquerait que FBXW4 empêche les cellules de devenir malignes ou ferait en sorte que les cellules malignes ne deviendraient pas plus agressives (Lockwood *et al.*, 2013). De plus, FBXW4 est souvent mutée, supprimée ou sous-exprimée dans certains cancers, laissant supposer qu'elle aurait une activité anti-cancer ou suppressive (Lockwood *et al.*, 2013). Finalement, on croit que FBXW4 aurait un rôle à jouer dans la formation des membres durant l'embryogenèse en plus d'être impliquée dans un trouble appelé *split-hand/split-foot malformation* de type 3 (SHFM3) (Sidow *et al.*, 1999).

5.4. SHFM3

Le SHFM3 est caractérisé par une hypoplasie des doigts et/ou des orteils en présence ou non de syndactylie ou encore une d'une ectrodactylie, soit une séparation marquée donnant aux mains et/ou aux pieds une forme dite en pince de crabe (Temtamy et McKusick, 1978; Nunes *et al.*, 1994). Dans la littérature, le SHFM3 a été associé avec le locus 10q24. Il a été rapporté que, chez les patients atteints de la maladie, tous présentaient des mutations dans ce locus (Gurrieri *et al.*, 1996). Bien que ce dernier contienne plusieurs gènes, FBXW4 se trouve à être un candidat fort selon des analyses d'expression et des modèles murins atteints de dactylaplasie, soit une absence des doigts centraux (Ianakiev *et al.*, 1999; Sidow *et al.*, 1999). Cependant, aucun lien formel n'a pu être établi puisque tous les patients présentaient des réarrangements complexes sur le locus 10q24.

5.4.1. Causes

Le SHFM3 est causé par une formation inadéquate des membres lors de l'embryogenèse (Lyle *et al.*, 2006). Pour que l'embryogenèse appendiculaire puisse avoir lieu normalement, elle doit être régulée par l'ubiquitination de plusieurs protéines. De fait, c'est l'activité de deux zones qui sont cruciales au développement des membres qui doit l'être, soit la zone d'activité polarisante (ZPA) et la crête ectodermale apicale (AER). Ces deux constituants, qui proviennent respectivement du mésoderme et de l'ectoderme, interagissent en co-dépendance par l'échange de signaux (Sifakis *et al.*, 2001).

Un défaut dans l'ubiquitination de la ZPA et de l'AER peut entraîner la dégradation de ces structures qui ne peuvent plus communiquer entre elles (Lyle *et al.*, 2006). De manière plus spécifique, on pense que FBXW4 favoriserait la dégradation d'un suppresseur de l'AER et que son

inactivation l'en empêcherait, entraînant par le même fait la destruction de l'AER (Sifakis *et al.*, 2001).

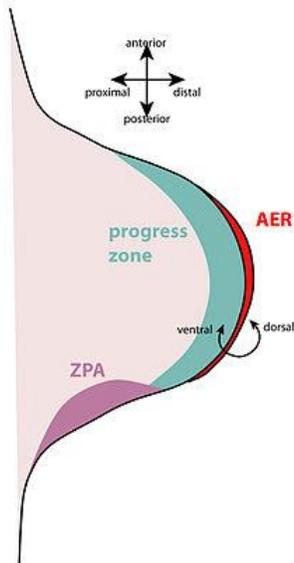
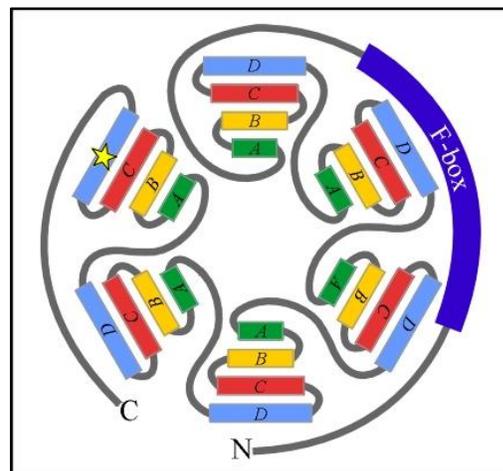


Figure 12 : Interaction entre l'AER et la ZPA dans le développement des membres (Source : Studyblue).

6. Cas cliniques

Dans deux cas cliniques de SHFM3, une mutation faux-sens hétérozygote a été rapportée dans le gène *FBXW4* du locus 10q24. Aucun cas de SHFM3 ne portant qu'une mutation unique n'avait été rapporté par le passé (Holder-Espinasse *et al.*, 2019). Le gène muté a pour effet de changer la proline en position 376 par une glutamine. Il y a donc changement d'un acide aminé non polaire et aliphatique par un acide aminé polaire et non chargé. La mutation retrouvée chez les cas cliniques, que l'on appellera P376Q dans ce mémoire, est située dans le sixième domaine WD40 près de l'extrémité C-terminale. Elle est illustrée par l'étoile dans la Figure 13.

Figure 13: **Modèle prédit de FBXW4.** Six domaines *WD40 repeat domain* se retrouvent dans la protéine. Chacun de ceux-ci est composé de quatre brins antiparallèles. La mutation se trouve dans l'un de ces brins et pourrait donc affecter sa capacité de liaison avec des protéines cibles. (Image : Paul Isenring)



6.1. Premier cas clinique

Le premier cas clinique a été rapporté chez un homme blanc caucasien adulte. Ce cas, répertorié au Québec par notre laboratoire, présente une ectrodactylie des pieds avec absence des trois orteils centraux. Il présente également une scoliose dorsolombaire et des malformations de la bouche associées à une hypoplasie de plusieurs dents en plus d'être atteint d'une maladie rénale appelée sclérose glomérulaire focale et segmentaire.



Figure 14 : **Phénotype du cas index.** A) Déformation dite en pince de crabe par perte des rayons digitaux centraux (SHFM). B) Scoliose dorsolombaire vue à la tomodensitométrie sans contraste. C) Hypoplasie de plusieurs dents. D) Concrétions podocytaires hyperdenses vues à un examen ultrastructural du rein. Des signes de FGS étaient aussi présents sur la biopsie. (Images : Paul Isenring)

Afin de comprendre la provenance de cette mutation, les parents ont été testés. L'affiliation des parents a été démontrée, mais la mutation dans le gène *FBXW4* n'a été recensée ni chez le père ni chez la mère de l'individu (Figure 15). La mutation P376Q du cas clinique est donc une mutation de novo. Puisque le cas index n'a pas d'enfants, il n'a pas été possible de faire des études de ségrégation du gène.

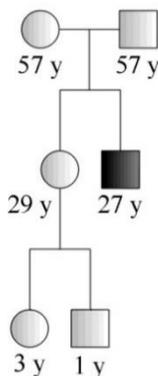


Figure 15 : **Pedigree du cas index.** La mutation P376Q n'a pas été retrouvée chez les parents malgré des liens de filiation prouvés. Elle est donc de novo. Pour cette raison, la sœur du cas index ainsi que ses deux enfants n'ont pas été testés pour la présence de cette mutation. (Image : Paul Isenring)

6.1.1. Sclérose glomérulaire focale et segmentaire

La sclérose glomérulaire focale et segmentaire est une maladie rénale touchant le glomérule du rein, soit l'unité fonctionnelle permettant la filtration du sang. Dans cette maladie, des lésions de fibrose touchent un nombre restreint de glomérules et seulement une partie du glomérule atteint. Les symptômes associés sont une insuffisance rénale et une protéinurie chez plusieurs, sinon la plupart (Rosenberg et Copp, 2017). La dialyse ou la transplantation rénale est requise lorsque la dysfonction rénale devient trop sévère (Sprenger-Mähr *et al.*, 2017). La cause de la maladie chez le cas clinique est inconnue, mais une accumulation de protéines non ubiquitinées dans le rein est suspectée.

6.2. Deuxième cas clinique

Le deuxième cas clinique a été rapporté chez un enfant californien. Ce patient est aussi atteint d'ectrodactylie des pieds comme le premier cas clinique en plus de présenter une insuffisance rénale. Vu la découverte récente de ce cas clinique, aucune autre information, telle que son phénotype ou son pedigree, n'est disponible.

L'ectrodactylie et les problèmes rénaux dont sont atteints ces cas cliniques, qui portent tous deux la même mutation P376Q dans FBXW4, nous laissent croire que cette mutation cause la maladie chez chacun d'eux.

7. Hypothèses et objectifs

Comme il a été discuté précédemment, plusieurs indices laissent croire que FBXW4 serait une composante du complexe SCF et qu'elle interviendrait dans le processus d'ubiquitination. Tout d'abord, elle possède un domaine F-box qui lui permet d'interagir avec les autres protéines du complexe ainsi qu'avec les protéines ubiquitinées et ensuite, elle possède des domaines WD40 qui pourrait lui permettre de faire des interactions avec des substrats potentiels. De plus, malgré son rôle présumé dans le SHFM3, FBXW4 n'a jamais été formellement établi comme étant le gène en cause vu la multitude d'autres gènes présents sur le locus 10q24 (Holder-Espinasse *et al.*, 2019). Cependant, la découverte des deux cas cliniques portant une mutation ponctuelle unique dans le locus nous a incités à réaliser de nouvelles études pour comprendre le rôle de FBXW4 dans le développement du SHFM3.

Les objectifs de ce projet étaient donc de 1) démontrer que FBXW4 fait bel et bien partie du complexe SCF et qu'elle est impliquée dans le processus d'ubiquitination, 2) de montrer que FBXW4 existe en dimère et qu'une mutation dans cette protéine pourrait donc avoir un effet dominant négatif en théorie et 3) que le résidu en position 376 joue un rôle à la fois dans le processus d'ubiquitination, d'oligomérisation et dans la liaison avec le reste du complexe via Skp1.

Nous croyons que la mutation P376Q entraîne un changement important dans la conformation de FBXW4 ce qui altère la composition du complexe SCF/FBXW4 et l'ubiquitination de certains substrats cibles. Il en résulterait un trouble de la croissance des membres et une atteinte rénale de type sclérose glomérulaire focale et segmentaire.

Chapitre 1: MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Vecteur utilisé pour les constructions

Tous les ADNc d'intérêt ont été insérés dans le vecteur maison Pol1. Les constructions produites ont été injectées sous forme d'ARNc pour permettre leur expression hétérologue dans des ovocytes de *Xenopus laevis*. Le vecteur Pol1 est dérivé du vecteur pGEM et contient (5' vers 3') un promoteur bactérien T7, le gène non traduit 5' de la β -globine de *Xenopus laevis* (5' UTR), un site de clonage multiple, le gène non traduit 3' de la β -globine de *Xenopus laevis* (3' UTR), une queue polyA et un site de linéarisation multiple pour la fabrication d'ARNc. Le site de linéarisation NheI a été utilisé pour FBXW4 et Skp1 et le site de linéarisation Scal pour l'ubiquitine.

2. Clonage de Skp1, FBXW4 et ubiquitine

La construction de Ha-hUbiquitine était déjà disponible au laboratoire dans le vecteur BSSK. La construction a été fabriquée par Mathias Treier au sein du laboratoire du Dr Dirk Bonhmann le 27 juin 1997. Le gène a été sorti du vecteur BSSK et inséré dans le vecteur Pol1 pour les expériences subséquentes. Tous les autres ADNc ont été clonés par PCR à partir d'un rein humain avant d'être insérés dans le vecteur Pol1.

Insert	Protéine produite
Ha-hUbiquitine	Épitope Ha suivi de l'ubiquitine humaine
hSkp1-Flag	Skp1 humain suivi de l'épitope Flag
hFBXW4-Myc	FBXW4 humain suivi de l'épitope Myc
hFBXW4 _{P376Q} -Myc	FBXW4 humain suivi de l'épitope Myc avec P ³⁷⁶ → Q ³⁷⁶
hFBXW4 _{P376R} -Myc	FBXW4 humain suivi de l'épitope Myc avec P ³⁷⁶ → R ³⁷⁶
hFBXW4 _{P376W} -Myc	FBXW4 humain suivi de l'épitope Myc avec P ³⁷⁶ → W ³⁷⁶
hFBXW4-Flag	FBXW4 humain suivi de l'épitope Flag
hFBXW4 _{P376Q} -Flag	FBXW4 humain suivi de l'épitope Flag avec P ³⁷⁶ → Q ³⁷⁶
hFBXW4 _{P376R} -Flag	FBXW4 humain suivi de l'épitope Flag avec P ³⁷⁶ → R ³⁷⁶
hFBXW4 _{P376W} -Flag	FBXW4 humain suivi de l'épitope Flag avec P ³⁷⁶ → W ³⁷⁶

Tableau 3 : **Liste des constructions utilisées** : Toutes les constructions ont été réalisées dans le vecteur Pol1. h = humain. La lettre majuscule indique l'acide aminé, le chiffre est la position et la flèche indique un changement d'acide aminé.

3. Création des constructions Ha-hUbiquitine, hFBXW4Myc, hFBXW4Flag et hSkp1Flag

3.1. Ha-hUbiquitine

Tel que mentionné précédemment, la construction de Ha-hubiquitine était déjà disponible au laboratoire. Pour l'insérer dans le vecteur Pol1, une mutagenèse en amont de l'ADNc a été effectuée pour insérer un site de restriction EcoRI. Un autre site de restriction EcoRI était déjà présent à la fin de l'ADNc tout juste avant le codon stop. Grâce aux deux sites EcoRI de part et d'autre de Ha-hUbiquitine, cet ADNc a pu être inséré dans le vecteur Pol1. Une deuxième mutagenèse a ensuite été effectuée pour rajouter un codon stop manquant.

Nom	Séquence
Site de restriction EcoRI 5' Ha-hubiquitine	Sens : TCGGGGGGGTGAATTCCGCCACCATG Anti-sens : TCTGACGGTTCCTAAACGAGC
Mutation stop Ha-hubiquitine	Sens : TGATCTAGAGCAAGCTTGATCTGGTTAC Anti-sens : GAATTCCTGCAGCCCGGG

Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés pour la construction de Ha-hUbiquitine

3.2. hFBXW4Myc et hFBXW4Flag

L'ADNc de FBXW4 a été cloné d'une banque d'ADNc dérivée des ARN messagers de cellules HEK-293. Cet ADNc a ensuite été inséré dans le vecteur PCR2.1. La digestion avec l'enzyme EcoRI a permis l'insertion dans le vecteur Pol1. Pour l'insertion de l'épitope Myc (EQKLISEEDL) et Flag (DYKDDDDK), le codon stop a été muté en site de restriction XhoI.

Nom	Séquence
Clonage FBXW4	Sens : CCGGGAAGAGCACAGGGACG Anti-sens : CCTGAGTAGCTGGTTTCCCTGGC
Site de restriction XhoI 3' FBXW4	Sens : TTCAAACCCTCGAGCGTCAGGGCC Anti-sens : AATCCAGGACGTGGAGGT
Tag Myc FBXW4	Sens : TCGAGCTCGATCGGAGCAGAAGCTGATCTCTGAGGAAGACCTCTAAC Anti-sens : TCGAGTTAGAGGTCTTCTCAGAGATCAGCTTCTGCTCCGATCGAGC
Tag Flag FBXW4	Sens : TCGAGCTCGATCGGACTACAAAGACGATGACGACAAGTAAC Anti-sens : TCGAGTTACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCGATCGAGC

Tableau 5 : Oligonucléotides utilisés pour les constructions de FBXW4

3.3. hSkp1Flag

L'ADNc de Skp1 a été cloné d'une banque d'ADNc dérivée des ARN messagers de cellules HEK-293 et inséré dans le vecteur PCR2.1. Une mutagenèse a ensuite été réalisée afin d'insérer un site de restriction BamHI en aval de l'ADNc. Un autre site BamHI présent en amont a permis de sortir Skp1 de PCR2.1 et de l'insérer dans le vecteur Pol1. Le codon stop de Skp1 a finalement été muté en site de restriction XhoI pour permettre l'insertion de l'épitope Flag en C-terminal.

Nom	Séquence
Clonage Skp1 F	Sens : TTTCTCTTCCTTCGCTAACG Anti-sens : GCTGCTGCATTTGTCTACTG
Site de restriction BamHI Skp1	Sens : ACTGTAAGGATCCTTCCAATACTAGTTGCAC Anti-sens : GTTACAGTGTGAGGCACAAC
Site de restriction XhoI Skp1	Sens: TGAAGAGAAGCTCGAGGTTGTGCCTGAC Anti-sens: CACCACTGGTTCTCTTTG
Tag Flag Skp1	Sens: TCGAAGACTACAAAGACGATGACGACAAGTAAT Anti-sens: TCGAATTACTTGTGTCATCGTCTTTGTAGTCT

Tableau 6 : Oligonucléotides utilisés pour la construction de Skp1

4. Mutagenèse de FBXW4

4.1. Stratégies de mutagenèse

En plus de la protéine sauvage, trois mutants de FBXW4 ont été fabriqués. À chaque mutant ont été ajoutés un épitope Myc ou Flag pour permettre la détection par des anticorps lors d'expériences de Western blot ou d'immunofluorescence. Ainsi, 8 constructions de FBXW4 ont été obtenues : hFBXW4Myc, hFBXW4^{P376Q}-Myc, hFBXW4^{P376R}-Myc, hFBXW4^{P376W}-Myc, hFBXW4Flag, hFBXW4^{P376Q}-Flag, hFBXW4^{P376R}-Flag et hFBXW4^{P376W}-Flag.

Nom	Séquence
Mutation FBXW4^{P376Q}	Sens : CACGCCTTCCAGCTGACGTCG Anti-sens : CAGGCAGGCCCTTTGACG
Mutation FBXW4^{P376R}	Sens: CACGCCTTCCGGCTGACGTCG Anti-sens : CAGGCAGGCCCTTTGACG
Mutation FBXW4^{P376W}	Sens: CACGCCTTCTGGCTGACGTCGACTCG Anti-sens : CAGGCAGGCCCTTTGACG

Tableau 7 : Oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse de FBXW4

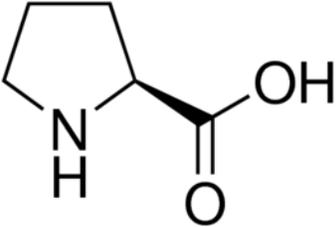
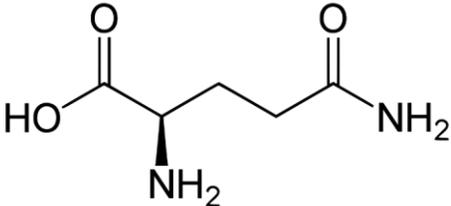
À la suite des mutagenèses effectuées sur FBXW4, la proline (P) normalement retrouvée en position 376 a été mutée en glutamine (Q), arginine (R) ou tryptophane (W).

	360		380
FBXW4		VVRLWDRRQRACLHAF	PLTST
FBXW4P376Q		VVRLWDRRQRACLHAF	QLTST
FBXW4P376R		VVRLWDRRQRACLHAF	RLTST
FBXW4P376W		VVRLWDRRQRACLHAF	WLTST

Figure 16 : Résultats des mutagenèses sur la séquence en acides aminés de FBXW4

4.2 Choix des mutants

Les mutants hFBXW4_{P376R} et hFBXW4_{P376W} ont été créés afin d'étudier l'impact des propriétés physicochimiques de l'acide aminé se trouvant en position 376. L'arginine a été choisie pour sa charge positive, qui n'est pas retrouvée chez la proline de la protéine sauvage, et le tryptophane a été choisi à cause de sa géométrie particulière dont un groupement bicyclique que l'on ne retrouve que chez cet acide aminé. Le tableau 8 résume la structure et les propriétés physicochimiques des différents acides aminés en position 376 chez FBXW4.

Nom de l'acide aminé en position 376	Structure	Propriétés physicochimiques
Proline (P)		<ul style="list-style-type: none"> - Non polaire, non chargée; - Retrouvée chez la protéine sauvage
Glutamine (Q)		<ul style="list-style-type: none"> - Polaire, non chargée - Retrouvée chez le mutant hFBXW4_{P376Q}

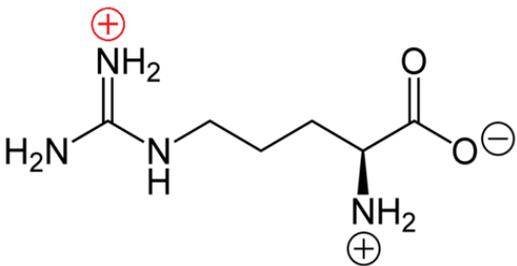
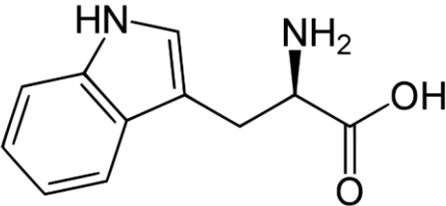
Arginine (R)		<ul style="list-style-type: none"> - Polaire, chargée - Retrouvée chez le mutant hFBXW4_{P376R}
Tryptophane		<ul style="list-style-type: none"> - Non polaire, non chargé - Retrouvé chez le mutant hFBXW4_{P376W} - Présence d'un groupement bicyclique

Tableau 8 : **Structure des acides aminés en position 376 des différents mutants de FBXW4 et propriétés physicochimiques.**

5. Validation

5.1. Vérification des séquences

Toutes les séquences des constructions ont été vérifiées par séquençage. Les oligonucléotides utilisés à cet effet sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Nom	Séquence	Rôle
Seq Skp1	CGTCTCCTTAACACCGAACA	Séquençage 5' Skp1
cSeq Skp1	GGAACAATCCTTACAGTGTTACAG	Séquençage 3' Skp1
cSeqHa-Ubi	CCATTCGGGTGTTCTTG	Seq ubiquitine
SeqFBXW4	CAGGACGGCCAAGGTGTGGC	Seq FBXW4 (5' vers 3')
cFBXW4seq	GCAATGGACCAGACTCG	Seq FBXW4 (3' vers 5')

Tableau 9 : **Oligonucléotides utilisés pour le séquençage des constructions**

6. Expression dans les ovocytes de *Xenopus laevis*

6.1. Validation de l'expression

À partir des constructions de FBXW4, Skp1 et ubiquitine, des ARNc sont produits grâce à la T7 polymérase (mMessage-mMachine, Ambion). Ces ARNc sont ensuite injectés dans les ovocytes

de *Xenopus laevis* défolliculés de stade V-VI (17,5 ng pour FBXW4, 1,25 ng pour l'ubiquitine et 0,5 ng pour Skp1).

Une fois injectés, les ovocytes sont incubés pendant 3 jours à 18°C dans une solution Barth pour permettre l'expression des protéines.

Composante	Concentration finale (mM)
Na ⁺	97
Cl ⁻	86
K ⁺	1
Ca ²⁺	0,74
Mg ²⁺	0,82
SO ₄ ²⁻	0,82
Hepes	10
NO ₃ ⁻	0,66
HCO ₃ ⁻	2,4
Osmolalité finale de la solution	200

Tableau 10 : **Composantes de la solution Barth**

Après les trois jours d'incubation, l'expression des protéines est validée par immunofluorescence ou par Western blot.

6.1.1. Immunofluorescence

Les ovocytes sont congelés dans un milieu OCT (Fisher). Des coupes cryogéniques de 10 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées et fixées dans le paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes. Par la suite, les protéines d'intérêt sont détectées avec des anticorps primaires, soit avec l'anti-myc (1/100, Sigma), l'anti-flag (1/400, Sigma) ou l'anti-HA (1/100, Roche). Un anticorps secondaire, un IgG de souris couplé à l'Alexa Fluor 488 (1/500, Invitrogen) est ensuite utilisé. Finalement, les lames sont révélées au microscope confocal (Olympus FV-1000).

6.1.2. Western blot

Les ovocytes sont lysés dans une solution Miki afin de récupérer les protéines d'intérêt.

Composante	Concentration finale
Tris pH 8.0	20 mM
EDTA	0,1 mM
MgCl ₂	1 mM
Glycérol	10%
Triton-X	1%
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	1mM
Complete Mini (cocktail d'inhibiteurs de protéases)	1 comprimé/10 ml de miki

Tableau 11 : **Composantes de la solution Miki**

Le lysat est dilué par un facteur 2 dans du tampon Laemmli (4% SDS, 20% glycérol, 10% 2-mercaptoéthanol, 0,004% bleu de bromophénol et 0,125 M Tris HCl) avant d'être déposé sur gel de polyacrylamide 10%. Les protéines sont ensuite analysées par immunobuvardage de type Western blot. Pour permettre la détection, un anticorps primaire, soit l'anti-myc (1/500, Sigma), l'anti-flag (1/4000, Sigma) ou l'anti-HA (1/500, Sigma) ont été utilisés suivi d'un anticorps secondaire anti-souris TrueBlot®, une IGg couplée à la HRP (1/5000, Rockland).

7. Co-immunoprécipitations

Les interactions entre FBXW4 et Skp1 ou FBXW4 ont été étudiées par des expériences de co-immunoprécipitation. Pour ce faire, les injections sont réalisées en duplicata avec les combinaisons d'ARNc suivantes :

- 1) hFBXW4Myc (WT, P376Q, P376R ou P376W) + Ha-hubiquitine
- 2) hFBXW4Myc (WT ou P376Q) + hSkp1Flag
- 3) hFBXW4Myc (WT, P376Q, P376R ou P376W) + hFBXW4Flag (WT, P376Q, P376R ou P376W)

Les ovocytes sont ensuite lysés. Une partie du lysat est conservée afin de mesurer le taux d'expression des protéines dans chaque échantillon. Cet échantillon du lysat est appelé « protéines totales ». Le reste du lysat est utilisé pour l'immunoprécipitation.

Pour chaque duplicata d'échantillons, le premier est immunoprécipité avec un anticorps dirigé vers une des deux protéines et détecté avec l'anticorps dirigé vers l'autre. Ensuite, l'inverse est fait pour le deuxième échantillon. Les anticorps utilisés ont été anti-myc (1/100, Sigma) et anti-flag (1/400, Sigma). Une fois l'immunoprécipitation terminée, des billes magnétiques couplées à la protéine G (Thermo Fisher Scientific) sont ajoutées afin d'isoler les protéines d'intérêt (voir figure 17). Ces dernières sont par la suite rincées dans le TBST (0,2 M NaCl, 32 mM Tris-HCl, 7,4 mM Tris-Base, 1% Tween 20) avant d'être dissoutes dans du tampon Laemmli. Les échantillons obtenus sont ensuite analysés par Western blot.

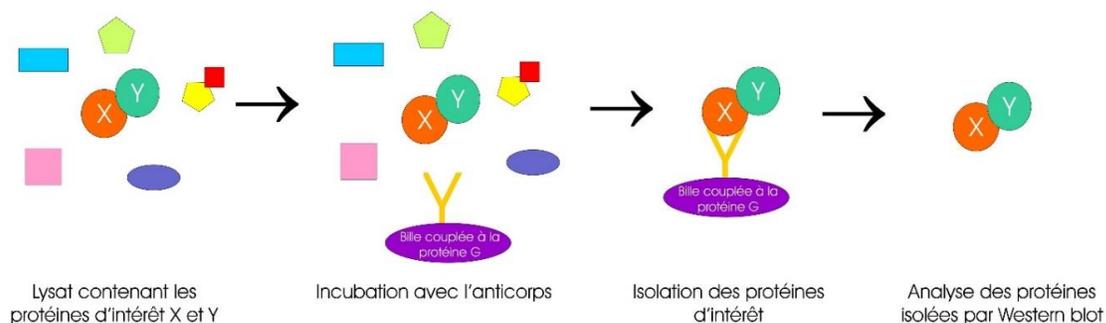


Figure 17 : Schéma du principe général d'une co-immunoprécipitation

Il est à noter que des expériences d'immunoprécipitation avec l'ubiquitine ont été abandonnées puisque les résultats sont plus ou moins fiables et difficilement interprétables. Seuls les échantillons de « protéines totales » ont été analysés.

Les différentes co-injections ainsi que les anticorps utilisés pour les immunoprécipitations et la détection des protéines sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Co-injection	Immunoprécipitation	Détection
FBXW4Myc (WT, P376Q, P376R ou P376W) + Ha-ubiquitine	Non	Ha
FBXW4Myc (WT ou P376Q) + Skp1Flag	Myc	Flag
FBXW4Myc (WT ou P376Q) + Skp1Flag	Flag	Myc
FBXW4Myc (WT, P376Q, P376R ou P376W) + FBXW4Flag (WT, P376Q, P376R ou P376W)	Myc	Flag
FBXW4Myc (WT, P376Q, P376R ou P376W) + FBXW4Flag (WT, P376Q, P376R ou P376W)	Flag	Myc
FBXW4Myc (WT) + FBXW4Flag (WT, P376Q, P376R ou P376W)	Myc	Flag
FBXW4Myc (WT) + FBXW4Flag (WT, P376Q, P376R ou P376W)	Flag	Myc

Tableau 12 : **Résumé des co-immunoprécipitations**

8. Quantification des résultats par densitométrie

L'intensité des bandes obtenues par Western blot est quantifiée par densitométrie grâce au logiciel Alphamager. Le bruit de fond est également calculé et soustrait du résultat. Un ratio des protéines immunoprécipitées sur les protéines totales est ensuite réalisé afin de normaliser les résultats obtenus par rapport à leur expression dans les ovocytes.

9. Statistiques

Les expériences sont répétées plusieurs fois et les résultats sont présentés sous forme de moyenne avec leur écart-type. Le test statistique utilisé entre les groupes de variables est un test de Student bilatéral où l'hypothèse nulle est rejetée pour une valeur de $P < 0,05$.

Chapitre 2: RÉSULTATS

1. Immunofluorescences

1.1. Constructions FBXW4Myc

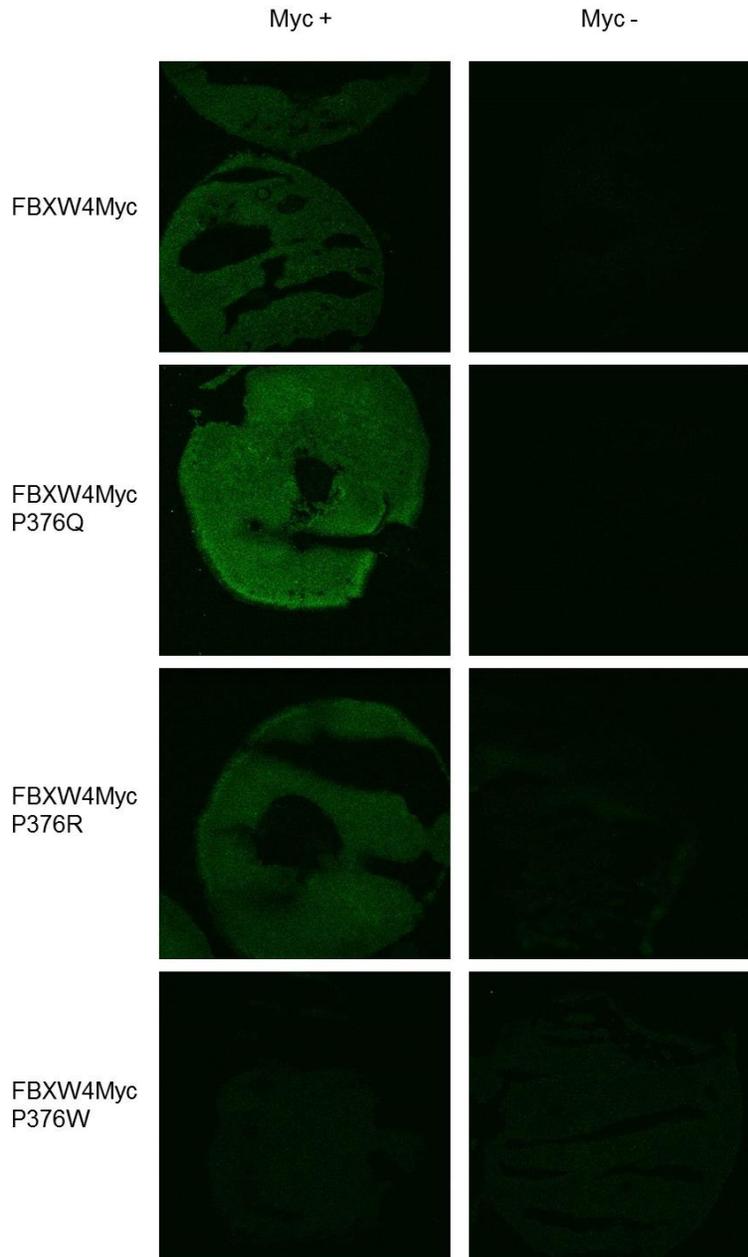


Figure 18 : **Résultats des immunofluorescences des constructions de FBXW4Myc.** À gauche sont représentés les ovocytes détectés avec l'anticorps primaire myc et à droite, leur contrôle négatif où aucun anticorps primaire n'a été appliqué. Les contrôles négatifs donnent les mêmes résultats que les ovocytes injectés avec de l'eau et détectés avec l'anticorps primaire (non représentés ici).

Les constructions FBXW4Myc, FBXW4MycP376Q et FBXW4P376R détectées avec l'anticorps myc s'associent à une forte fluorescence comparativement au contrôle négatif, ce qui indique qu'elles sont bien exprimées. La construction FBXW4MycP376W, quant à elle, ne montre pas une forte fluorescence.

1.2. Constructions de FBXW4Flag

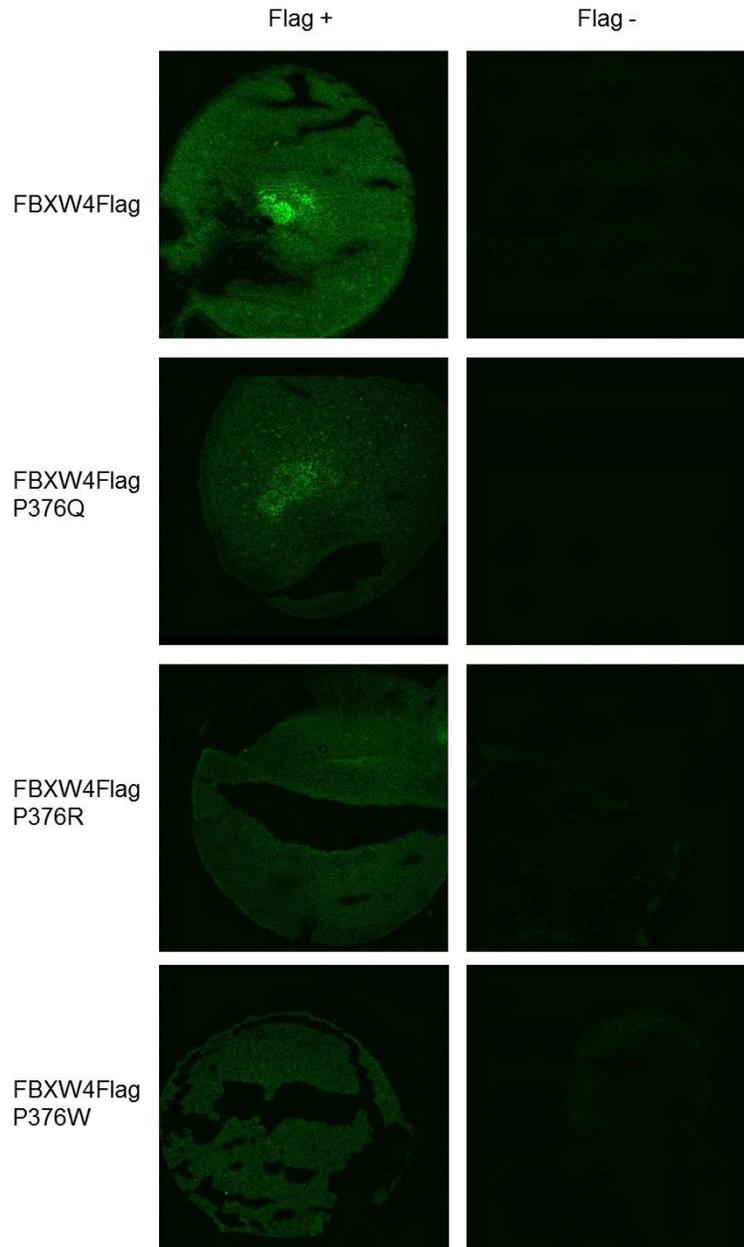


Figure 19 : **Résultats des immunofluorescences des constructions de FBXW4Flag.** À gauche sont représentés les ovocytes détectés avec l'anticorps primaire flag et à droite, leur contrôle négatif où aucun anticorps primaire n'a été appliqué. Les contrôles négatifs donnent les mêmes

résultats que les ovocytes injectés avec de l'eau et détectés avec l'anticorps primaire (non représentés ici).

Les quatre constructions expriment une fluorescence. Malgré que cette dernière varie entre les constructions, une différence importante est observée comparativement au contrôle négatif, ce qui indique que les protéines sont bien exprimées.

1.3. Skp1

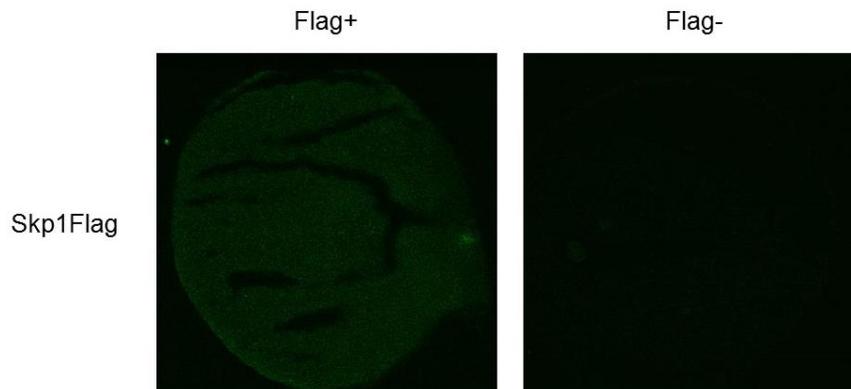


Figure 20 : **Résultats des immunofluorescences de la construction Skp1Flag.** À gauche est représenté l'ovocyte détecté avec l'anticorps primaire flag et à droite, un contrôle négatif où aucun anticorps primaire n'a été appliqué. Le contrôle négatif donne les mêmes résultats que l'ovocyte injecté avec de l'eau et détecté avec l'anticorps primaire (non représenté ici).

On observe de la fluorescence dans l'ovocyte détecté avec l'anticorps flag, ce qui indique la présence de la protéine.

1.4. Ubiquitine

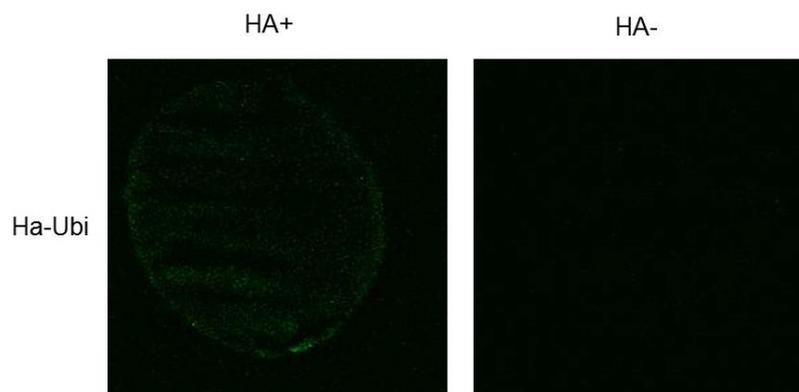


Figure 21 : **Résultats des immunofluorescences de la construction Ha-ubiquitine.** À gauche est représenté l'ovocyte détecté avec l'anticorps primaire HA et à droite, un contrôle négatif où aucun anticorps primaire n'a été appliqué. Le contrôle négatif donne les mêmes résultats que l'ovocyte injecté avec de l'eau et détecté avec l'anticorps primaire (non représenté ici).

L'ovocyte détecté avec l'anticorps HA semble exprimer une fluorescence plus importante que le contrôle négatif, ce qui confirme la présence de la protéine.

2. Co-immunoprécipitations

2.1. Co-immunoprécipitations entre FBXW4 et Skp1

2.1.1. IP FBXW4, détecté Skp1

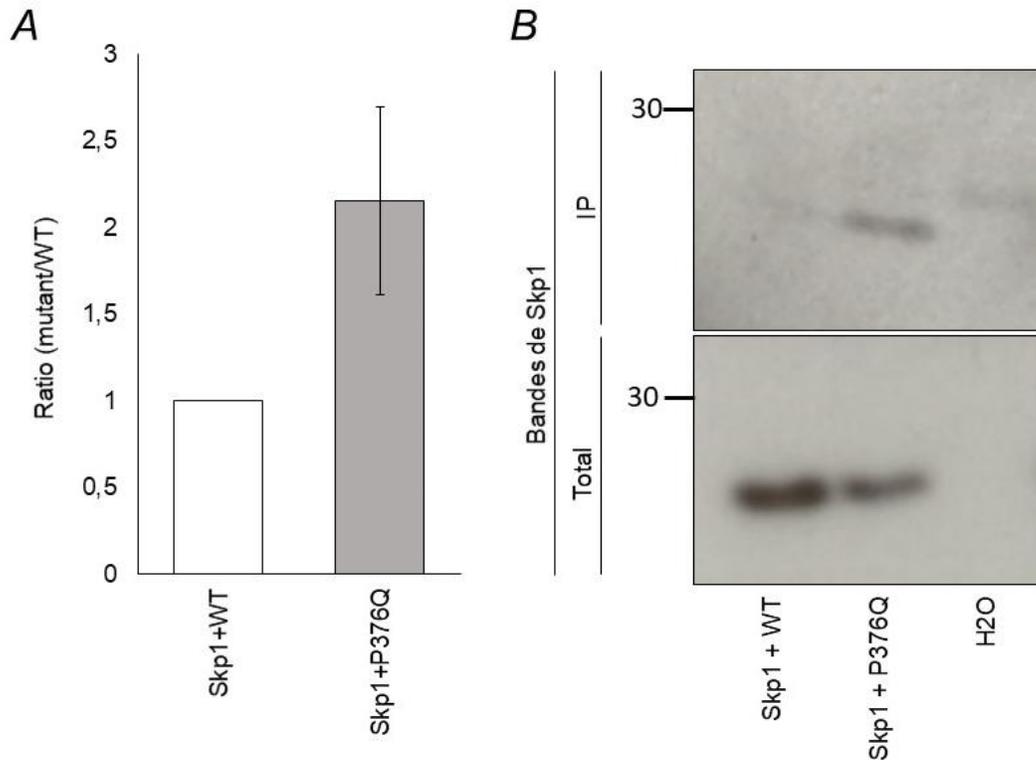


Figure 22: Résultats des co-immunoprécipitations entre FBXW4 et Skp1 (IP FBXW4, détecté Skp1) (WT = FBXW4 sauvage, P376Q = FBXW4_{P376Q}). Les résultats montrent des échantillons pour lesquels FBXW4 a été immunoprécipité suivi par une détection de Skp1. A) Les données sont présentées comme des ratios moyens de densités entre mutant et WT \pm erreur type de la moyenne. Le bruit de fond a aussi été soustrait et les résultats normalisés en divisant la densité des protéines IP par les protéines totales (la plus forte densité pour chaque expérience). La comparaison des résultats est faite par rapport à la condition « Skp1 + WT », le ratio de celle-ci étant établie à 1 comme valeur de référence, d'où l'absence de barre d'erreur pour ce résultat ($P=0,078092476$, $n = 7$). B) Image illustrant les résultats obtenus par Western blot. En haut sont présentés les résultats des IP et en bas, les résultats des protéines totales.

Les résultats des co-IP ont révélé des bandes plus abondantes pour l'échantillon Skp1 + FBXW4_{P376Q} que pour l'échantillon Skp1 + FBXW4 (voir panneau B qui illustre les résultats

obtenus). Toutefois, l'expression de Skp1 n'était pas équivalente entre les échantillons dans les protéines totales. La moyenne des résultats normalisés montre malgré tout que la co-immunoprécipitation entre Skp1 et le mutant P376Q est environ 2,2 fois plus importante qu'avec la protéine sauvage (voir panneau A).

2.1.2. IP Skp1, détecté FBXW4

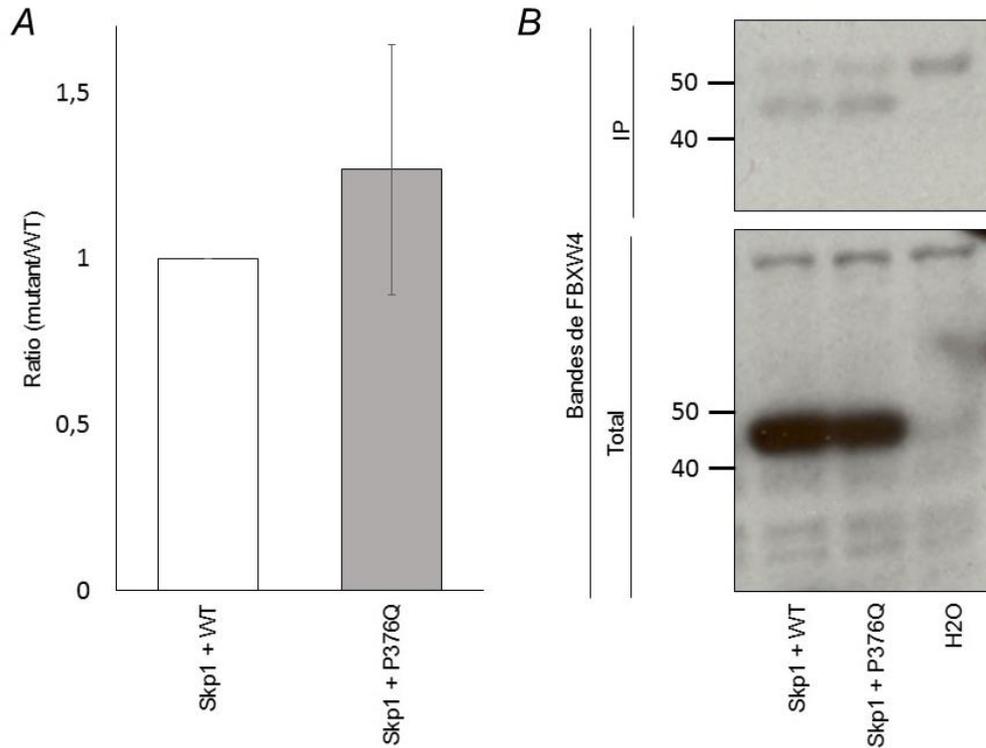


Figure 23: **Résultats des co-immunoprécipitations entre FBXW4 et Skp1 (IP Skp1, détecté FBXW4)** (WT = FBXW4 sauvage, P376Q = FBXW4_{P376Q}). Les résultats montrent des échantillons pour lesquels Skp1 a été immunoprécipité suivi par une détection de FBXW4. A) Les données sont présentées comme des ratios moyens de densités entre mutant et WT \pm erreur type de la moyenne. Le bruit de fond a aussi été soustrait et les résultats normalisés en divisant la densité des protéines IP par les protéines totales (la plus forte densité pour chaque expérience). La comparaison des résultats est faite par rapport à la condition « Skp1 + WT », le ratio de celle-ci étant établie à 1 comme valeur de référence, d'où l'absence de barre d'erreur pour ce résultat ($P=0,5295754$, $n=4$). B) Image illustrant les résultats obtenus par Western blot. En haut sont présentés les résultats des IP et en bas, les résultats des protéines totales.

Pour ce qui est de l'expérience inverse, soit l'immunoprécipitation de Skp1 suivie de la détection de FBXW4, on observe aussi une augmentation de la co-immunoprécipitation entre Skp1 et

FBXW4_{P376Q} comparativement à Skp1 avec FBXW4 (panneau A). Ce résultat n'est cependant pas significatif ($P > 0,05$). Pour cette expérience, seules 4 expériences ont été compilées.

2.2. Co-immunoprécipitations entre FBXW4 sauvage et les différents mutants de FBXW4

2.2.1. IP Flag, détecté Myc

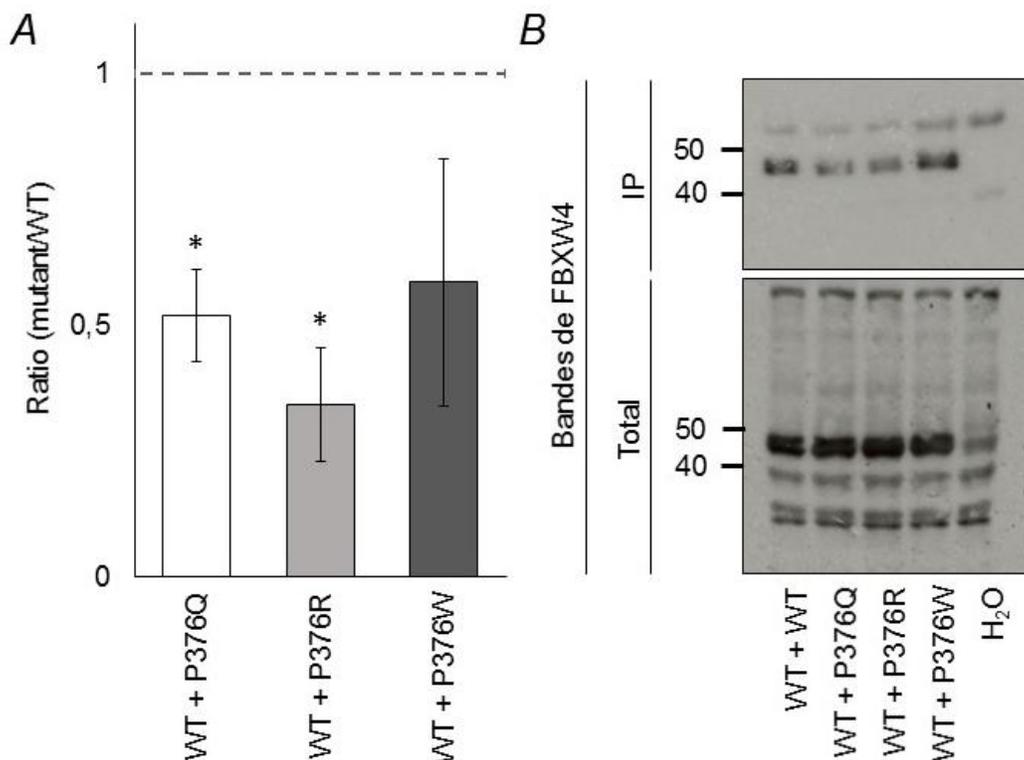


Figure 24: **Résultats des co-immunoprécipitations entre FBXW4 sauvage et les différents mutants de FBXW4** (WT = FBXW4 sauvage, P376Q = FBXW4_{P376Q}, P376R = FBXW4_{P376R}, P376W = FBXW4_{P376W}). Les résultats montrent des échantillons pour lesquels FBXW4 a été immunoprécipité avec l'anticorps Flag et détecté avec l'anticorps Myc. A) Les données sont présentées comme des ratios moyens de densités entre mutant et WT \pm erreur type de la moyenne. Le bruit de fond a aussi été soustrait et les résultats normalisés en divisant la densité des protéines IP par les protéines totales (la plus forte densité pour chaque expérience). La comparaison des résultats est faite par rapport à la condition « WT + WT », le ratio de celle-ci étant établie à 1 comme valeur de référence et représenté en pointillé (pour WT + P376Q, $P=0,01382966$, pour WT + P376R, $P=0,010113817$ et WT + P376W, $P=0,19181151$, $n=4$). B) Image illustrant les résultats obtenus par Western blot. En haut sont présentés les résultats des IP et en bas, les résultats des protéines totales.

Tous les Western blot obtenus ont montré des bandes plus pâles pour ce qui est des échantillons IP de WT + P376Q et de WT+P376R (voir panneau B qui illustre les résultats). Pour les échantillons

WT + P376W, les résultats étaient plus variables. La compilation des données a ainsi montré une diminution significative de l'interaction entre FBXW4_{WT} avec FBXW4_{P376Q}, de l'ordre d'environ 0,5 fois, ainsi qu'entre FBXW4_{WT} avec FBXW4_{P376R}, de l'ordre d'environ 0,3 fois, comparativement aux deux protéines sauvages ensemble (voir panneau A). L'expression des différents FBXW4 était semblable, diminuant par le fait même l'effet de la normalisation.

2.2.2. IP Myc, détecté Flag

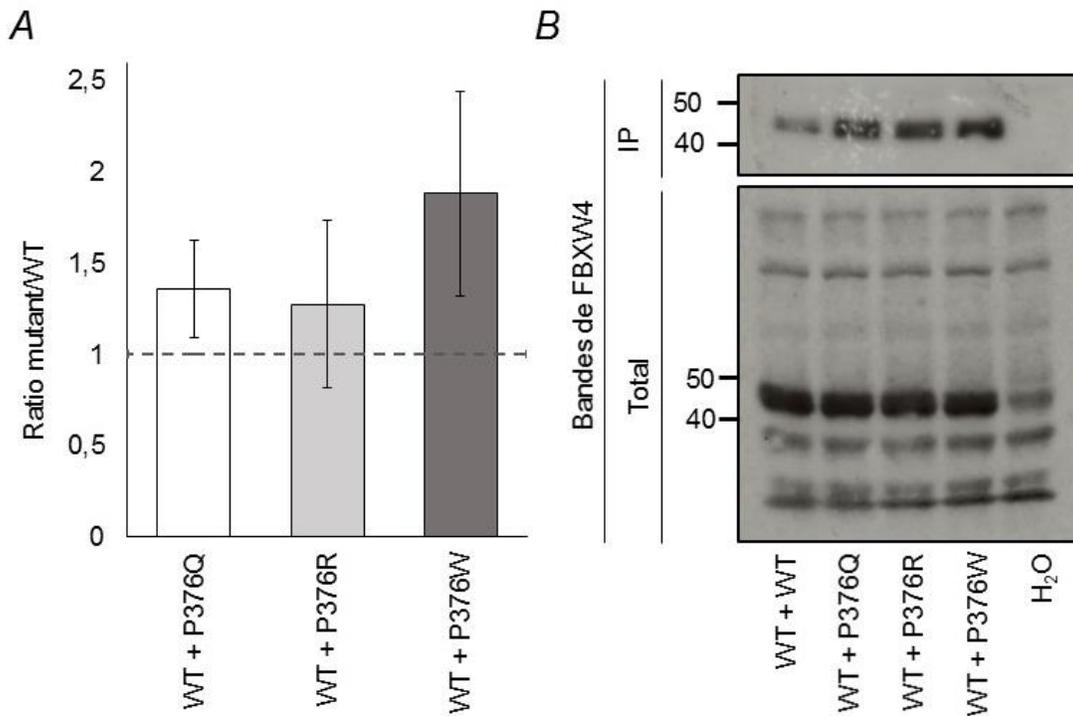


Figure 25: **Résultats des co-immunoprécipitations entre FBXW4 sauvage et les différents mutants de FBXW4** (WT = FBXW4 sauvage, P376Q = FBXW4_{P376Q}, P376R = FBXW4_{P376R}, P376W = FBXW4_{P376W}). Les résultats montrent des échantillons pour lesquels FBXW4 a été immunoprécipité avec l'anticorps Myc et détecté avec l'anticorps Flag. A) Les données sont présentées comme des ratios moyens de densités entre mutant et WT \pm erreur type de la moyenne. Le bruit de fond a aussi été soustrait et les résultats normalisés en divisant la densité des protéines IP par les protéines totales (la plus forte densité pour chaque expérience). La comparaison des résultats est faite par rapport à la condition « WT + WT », le ratio de celle-ci étant établie à 1 comme valeur de référence et représenté en pointillé (pour WT + P376Q, $P=0,30710505$, pour WT + P376R, $P=0,61030845$ et WT + P376W, $P=0,25501618$, $n=3$). B) Image illustrant les résultats obtenus par Western blot. En haut sont présentés les résultats des IP et en bas, les résultats des protéines totales.

Les résultats obtenus sont ceux de co-IP où les anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation et la détection ont été inversés par rapport aux expériences décrites ci-dessus. Dans l'exemple donné (panneau B), les bandes obtenues pour les trois mutants sont toutes plus foncées que celles obtenues pour les deux protéines sauvages ensemble. Par contre, une compilation des résultats n'a pas montré de différences significatives entre les protéines mutées et la protéine sauvage (panneau A). Les protéines totales, qui sont celles des différents mutants, montrent également une expression semblable.

2.3. Co-immunoprécipitations entre les différents mutants de FBXW4

2.3.1. IP Flag, détecté Myc

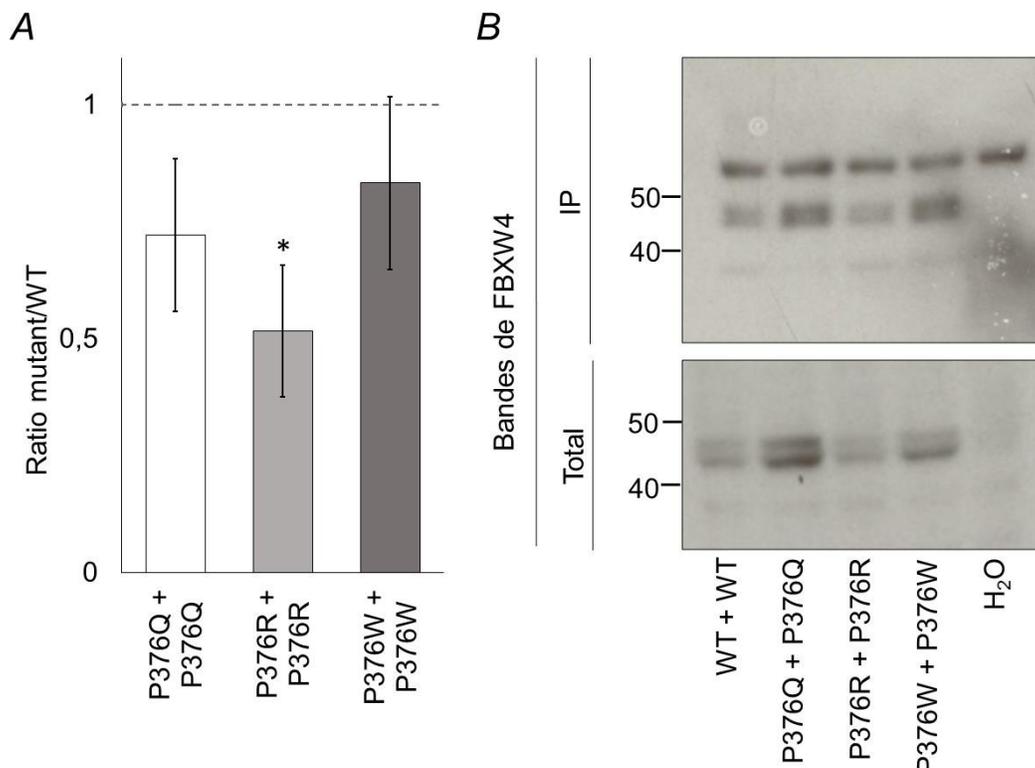


Figure 26: **Résultats des co-immunoprécipitations entre les mutants de FBXW4** (WT = FBXW4 sauvage, P376Q = FBXW4_{P376Q}, P376R = FBXW4_{P376R}, P376W = FBXW4_{P376W}). Les résultats montrent des échantillons pour lesquels FBXW4 a été immunoprécipité avec l'anticorps Flag et détecté avec l'anticorps Myc. A) Les données sont présentées comme des ratios moyens de densités entre mutant et WT \pm erreur type de la moyenne. Le bruit de fond a aussi été soustrait et les résultats normalisés en divisant la densité des protéines IP par les protéines totales (la plus forte densité pour chaque expérience). La comparaison des résultats est faite par rapport à la condition « WT + WT », le ratio de celle-ci étant établie à 1 comme valeur de référence et représenté en pointillé (pour P376Q + P376Q, P=0,23363827, pour P376R + P376R,

$P=0,02142571$ et $P376W + P376W$, $P=0,68925973$, $n=4$). B) Image illustrant les résultats obtenus par Western blot. En haut sont présentés les résultats des IP et en bas, les résultats des protéines totales.

Les résultats de la co-IP utilisés en illustration montrent des bandes plus foncées pour $P376Q + P376Q$ et $P376W + P376W$ comparativement à l'échantillon $WT + WT$ (panneau B). Pour $P376R + P376R$, on observe une bande plus pâle. Cependant, les protéines totales ne sont pas exprimées de façon équivalente parmi les échantillons. Après normalisation, les moyennes obtenues pour les trois échantillons donnent ainsi des résultats plus bas que pour l'échantillon $WT + WT$. Cependant, parmi ces trois résultats, seul $P376R + P376R$ est statistiquement différent de $WT + WT$.

2.3.2. IP Myc, détecté Flag

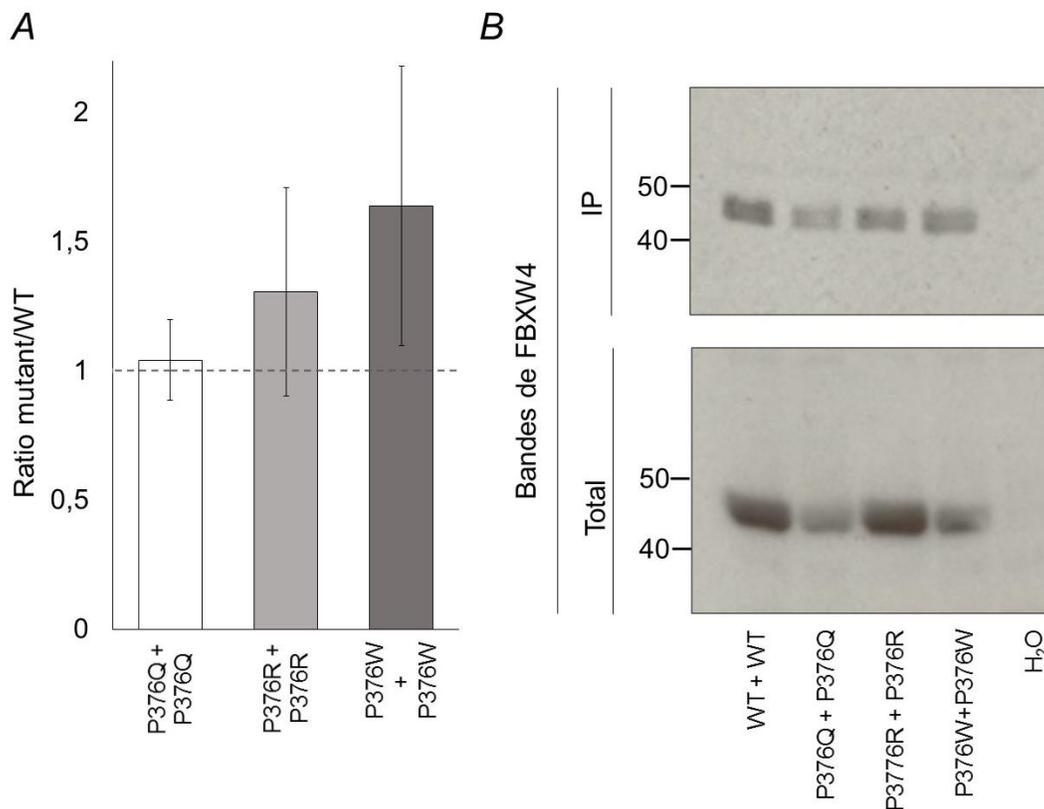


Figure 27: **Résultats des co-immunoprécipitations entre les mutants de FBXW4** (WT = FBXW4 sauvage, $P376Q = FBXW4_{P376Q}$, $P376R = FBXW4_{P376R}$, $P376W = FBXW4_{P376W}$). Les résultats montrent des échantillons pour lesquels FBXW4 a été immunoprécipité avec l'anticorps Myc et détecté avec l'anticorps Flag. A) Les données sont présentées comme des ratios moyens de densités entre mutant et WT \pm erreur type de la moyenne. Le bruit de fond a aussi été soustrait et les résultats normalisés en divisant la densité des protéines IP par les protéines totales (la plus forte densité pour chaque expérience). La comparaison des résultats est faite par rapport à la

condition « WT + WT », le ratio de celle-ci étant établie à 1 comme valeur de référence et représenté en pointillé (pour P376Q + P376Q, $P=0,80948851$, pour P376R + P376R, $P=0,50347164$ et P376W + P376W, $P=0,32413175$, $n=4$). B) Image illustrant les résultats obtenus par Western blot. En haut sont présentés les résultats des IP et en bas, les résultats des protéines totales.

Au final, les co-IP des mutants montrent des bandes plus foncées pour les mutants (panneau A). Les protéines totales n'étaient toutefois pas exprimées de manière équivalente (voir exemple panneau B). Après normalisation, les trois résultats montrent une augmentation de la co-IP entre les mutants comparativement à la protéine sauvage. Cependant, les différences n'étaient pas statistiquement significatives.

2.4. Patrons d'ubiquitination avec les différents mutants de FBXW4

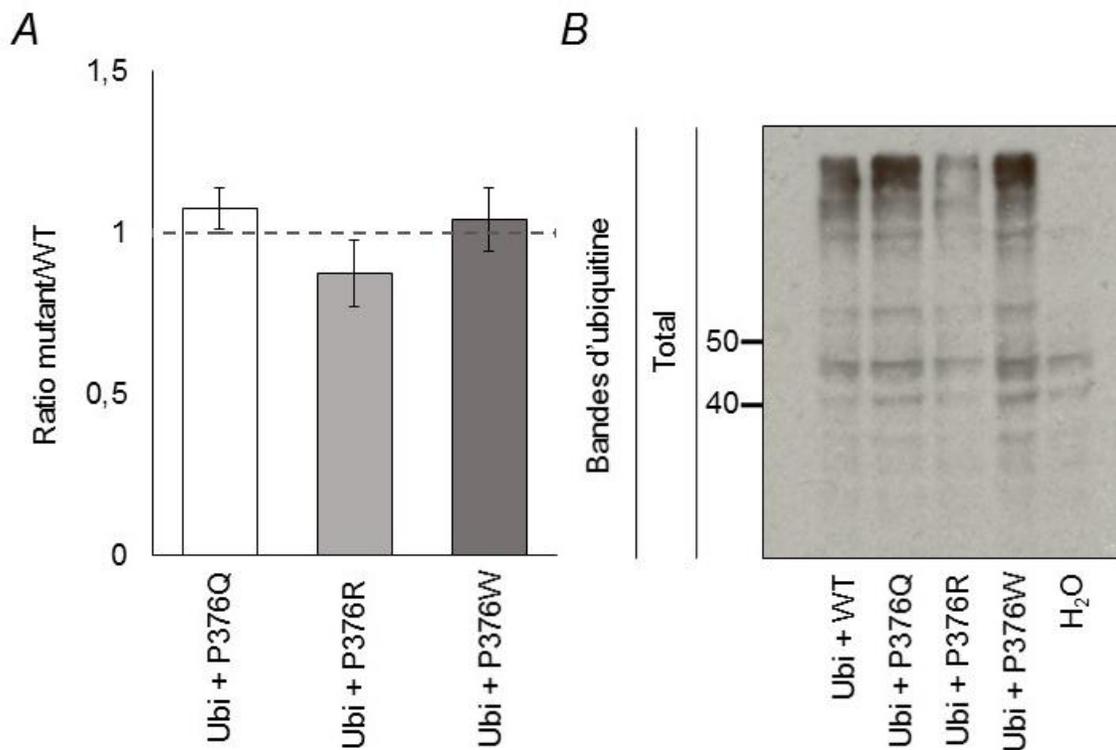


Figure 28: **Résultats des patrons d'ubiquitination en présence des différents mutants de FBXW4** (WT = FBXW4 sauvage, P376Q = FBXW4_{P376Q}, P376R = FBXW4_{P376R}, P376W = FBXW4_{P376W}). Les résultats montrent des échantillons non-immunoprécipités et détectés avec l'anticorps HA. A) Les données sont présentées comme des ratios moyens de densités entre mutant et WT \pm erreur type de la moyenne. Le bruit de fond a été soustrait et les résultats

normalisés en divisant par la densité des protéines totales (la plus forte densité pour chaque expérience). La comparaison des résultats est faite par rapport à la condition « Ubi + WT », le ratio de celle-ci étant établie à 1 comme valeur de référence et représenté en pointillé (pour P376Q + Ubi, $P=0,70869769$, pour P376R + Ubi, $P=0,27490961$ et P376W + Ubi $P=0,71561842$, $n=6$)

B) Image illustrant les résultats obtenus par Western blot. Les résultats des protéines totales sont présentés.

Après compilation des résultats, on observe des différences minimales entre les différents patrons d'ubiquitination et aucun de ces résultats n'est significatif.

Chapitre 3: DISCUSSION

Avant de débiter ce projet de recherche, des travaux antérieurs avaient déjà montré que FBXW4 pouvait interagir avec des protéines du complexe SCF, dont Skp1, et avec l'ubiquitine. Cependant, les déterminants de ces liaisons n'avaient pas encore été identifiés. De plus, la régulation de la protéine FBXW4 est encore très peu connue.

Avec la recension de deux cas cliniques présentant une mutation unique hétérozygote dans le gène FBXW4 du locus 10q24, nous avons pu identifier pour la première fois un acide aminé précis qui joue probablement un rôle dans la fonction de cette protéine. Nous avons plus particulièrement étudié les effets d'un changement de l'acide aminé en position 376 chez FBXW4 sur trois processus : l'homomérisation, la liaison au complexe SCF et l'ubiquitination.

Association avec le SHFM3

Les deux cas présentés ont permis de montrer pour la première fois que FBXW4 était fort probablement associé au SHFM3 et que le locus 10q24 n'avait pas besoin d'être réarrangé de manière grossière pour expliquer le phénotype. Fait à noter, les deux patients, l'un investigué dans mon laboratoire et l'autre identifié par la compagnie Fulgent, présentaient aussi une atteinte rénale en relation avec le variant retrouvé.

Oligomérisation de FBXW4

Ce projet a permis de découvrir que FBXW4 était organisé en homomères et que l'acide aminé retrouvé en position 376 chez FBXW4 jouait un rôle dans cet assemblage structural. En effet, deux des mutations que nous avons étudiées, soit les mutations FBXW4^{P376Q} (celle du patient) et FBXW4^{P376R}, diminuaient l'oligomérisation de la protéine. La proline à cette position est non-polaire et non-chargée alors que la glutamine retrouvée chez FBXW4^{P376Q} est polaire et l'arginine retrouvée chez FBXW4^{P376R} est polaire et chargée positivement. Les substitutions faites étaient donc de nature très peu conservatrices et indiquent que la proline native en position 376 ne se laisse pas substituée sans nuire à l'assemblage.

Il est toutefois à noter que la mutation P376Q ne diminue l'oligomérisation que si l'autre monomère est le FBXW4 sauvage. Bien que nous ne sachions pas pourquoi il en est ainsi, ces observations sont très pertinentes compte tenu du fait que la mutation retrouvée chez les cas cliniques est de type hétérozygote. Cette interaction FBXW4 – FBXW4^{P376Q} pourrait donc être fautive in vivo.

En ce qui concerne la mutation P376R, nos résultats ont indiqué qu'un tel changement entraînait une diminution de l'interaction entre deux protéines FBXW4^{P376R} ainsi qu'entre FBXW4 et FBXW4^{P376R}. Ces résultats laissent sous-entendre que l'addition d'une charge positive sur l'un des monomères ou sur les deux exerce un effet délétère sur l'homomérisation via un effet

conformationnel. La substitution par un résidu tryptophane, quant à elle, n'a pas engendré de changement significatif sans doute parce que ce résidu partage avec la proline les mêmes propriétés physicochimiques.

Pour plusieurs des co-immunoprécipitations FBXW4-FBXW4, que les protéines aient été mutées ou non, nous n'avons pu observer de résultats significatifs que dans un seul sens, c'est-à-dire, lorsque l'IP a été faite avec l'anticorps flag et la détection avec l'anticorps myc. Pour le moment, nous ne savons pas pourquoi il en a été ainsi, mais comme cette observation s'est répétée à plusieurs reprises, il est possible que l'anticorps flag ne soit pas aussi performant que l'anticorps myc pour des analyses quantitatives où les différences à observer sont faibles.

À la lumière de ces résultats, nous sommes tout de même portés à croire que la protéine mutée FBXW4_{P376R} et la protéine sauvage ne se lient pas avec autant d'affinité que les protéines sauvages entre elles et que le complexe hybride est en quelque sorte dysfonctionnel pour cette raison. Il y aurait donc lieu de penser qu'une partie des complexes FBXW4/Skp1/Cul1 formés chez le patient auraient une conformation impropre à l'ubiquitination optimale de substrats cibles. Il en résulterait ainsi une accumulation de protéines mal repliées dans le cytosol qui serait responsable du phénotype observé. Dans les podocytes où un matériel électro-dense a été observé, cette accumulation pourrait donc aussi expliquer la sclérose glomérulaire focale et segmentaire chez l'un des patients.

Liaison avec Skp1

Nos expériences nous ont également permis de confirmer l'interaction entre FBXW4 et Skp1 et ont montré que Skp1 se liait de manière plus importante avec la protéine FBXW4_{P376Q} qu'avec la protéine sauvage. Ces résultats laissent croire que le résidu 376 est impliqué dans le processus de liaison entre FBXW4 et le complexe SCF. Ils confirment aussi que la mutation identifiée chez le patient pourrait affecter l'intégrité conformationnelle du complexe FBXW4/Skp1/Cul1. On pourrait donc être tenté de croire qu'il y a plus de complexes SCF/FBXW4_{P376Q}/FBXW4_{WT} dans les cellules du malade qu'il n'y a de complexes SCF/FBXW4_{P376Q}/FBXW4_{P376Q} ou SCF/FBXW4_{WT}/FBXW4_{WT} et qu'il y aurait donc plus de complexes dysfonctionnels que fonctionnels.

Tel que mentionné, toutefois, les co-IP n'ont pas donné des résultats probants dans les deux sens. Plusieurs expériences où nous avons détecté FBXW4 à la suite de l'immunoprécipitation de Skp1 n'ont pas permis d'obtenir de résultats. Cela pourrait s'expliquer par la conformation du complexe Skp1/FBXW4. En effet, l'étiquette de Skp1 a été insérée dans le domaine C-terminal de la protéine, même domaine où a lieu la liaison avec FBXW4. Il est donc probable qu'une fois ces deux protéines liées, leur conformation rende plus difficile l'accès à l'étiquette de Skp1 par l'anticorps. La détection subséquente de FBXW4 en serait donc compromise. Pour l'expérience inverse où Skp1 a été détecté à la suite de l'immunoprécipitation de FBXW4, la conformation du complexe était

probablement favorable à l'anticorps pour se lier à l'étiquette de FBXW4 et permettre la détection de Skp1 par la suite.

Ubiquitination

Les patrons d'ubiquitination que nous avons obtenus en présence des différents mutants de FBXW4 n'ont pas montré de différence significative. Ces résultats pourraient laisser sous-entendre que l'ubiquitination n'est pas affectée par les mutations et donc que le résidu 376 n'est pas impliqué dans ce processus. Toutefois, les protéines ubiquitinées que nous avons révélés ne se limitaient pas aux substrats du complexe SCF/FBXW4 mais aux nombreux substrats de plusieurs autres complexes. Il pourrait donc avoir été très difficile d'observer des différences significatives à cause de l'importance du bruit de fond. Ces difficultés ont été rapportées dans plusieurs autres études par le passé (Emmerich et Cohen, 2015). Il est donc possible qu'un changement dans le patron d'ubiquitination soit survenu, mais que la différence n'était pas assez importante pour être détectée en Western blot.

CONCLUSION

En conclusion, nous avons pu mettre de l'avant l'importance du résidu 376 dans l'assemblage de FBXW4 avec lui-même et un autre partenaire, Skp1. D'après nos travaux, nous croyons que la mutation identifiée chez les deux patients affecte l'assemblage oligomérique de FBXW4, qu'elle est donc fort possiblement causale et qu'elle entraîne la maladie dû à un désordre de l'ubiquitination de certaines protéines durant le développement.

Afin de prouver que la mutation P376Q est responsable du SHFM3, il serait intéressant de développer un modèle murin hétérozygote FBXW4^{P376Q/WT}. Ce modèle nous permettrait de confirmer l'importance du gène dans la formation des membres et de la barrière glomérulaire.

Puisque FBXW4 a très peu été étudiée, les perspectives sont nombreuses. Tout d'abord, tel que mentionné, aucune protéine n'a été identifiée comme substrat du complexe SCF/FBXW4. Il serait donc très pertinent de découvrir la nature des substrats dégradés par ce complexe. Pour ce faire, des expériences de Bio-ID pourrait être réalisées afin d'isoler des protéines substrats candidates suivies de spectrométrie de masse pour les identifier. Il serait alors possible de faire des co-immunoprécipitations entre FBXW4 et les substrats identifiés pour étudier le rôle du résidu 376 dans la liaison avec ceux-ci.

Bibliographie

1. Aguilar, R. C. and Wendland, B. (2003) 'Ubiquitin: not just for proteasomes anymore', *Curr Opin Cell Biol*, 15(2), pp. 184-90.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition.
3. Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W. and Elledge, S. J. (1996) 'SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box', *Cell*, 86(2), pp. 263-74.
4. Banu, M., Patriche, S., Coman, M., Matsushita, S., Tofan, A. and Epureanu, A. (2011) 'Investigation of ubiquitin deformation mechanism under induced stretch-compression loads', *Rom J Morphol Embryol*, 52(1 Suppl), pp. 449-54.
5. Barbash, O., Zamfirova, P., Lin, D. I., Chen, X., Yang, K., Nakagawa, H., Lu, F., Rustgi, A. K. and Diehl, J. A. (2008) 'Mutations in Fbx4 inhibit dimerization of the SCF(Fbx4) ligase and contribute to cyclin D1 overexpression in human cancer', *Cancer Cell*, 14(1), pp. 68-78.
6. Bashir, T. and Pagano, M. (2003) 'Aberrant ubiquitin-mediated proteolysis of cell cycle regulatory proteins and oncogenesis', *Adv Cancer Res*, 88, pp. 101-44.
7. Bertoli, C., Skotheim, J. M. and de Bruin, R. A. (2013) 'Control of cell cycle transcription during G1 and S phases', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(8), pp. 518-28.
8. Bosu, D. R. and Kipreos, E. T. (2008) 'Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles', *Cell Div*, 3, pp. 7.
9. Bulatov, E. and Ciulli, A. (2015) 'Targeting Cullin-RING E3 ubiquitin ligases for drug discovery: structure, assembly and small-molecule modulation', *Biochem J*, 467(3), pp. 365-86.
10. Cadwell, K. and Coscoy, L. (2005) 'Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase', *Science*, 309(5731), pp. 127-30.
11. Cenciarelli, C., Chiaur, D. S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M. and Pagano, M. (1999) 'Identification of a family of human F-box proteins', *Curr Biol*, 9(20), pp. 1177-9.
12. Chen, J. and Chen, Z. J. (2013) 'Regulation of NF-kappaB by ubiquitination', *Curr Opin Immunol*, 25(1), pp. 4-12.
13. Ciechanover, A. (2005) 'Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting', *Cell Death Differ*, 12(9), pp. 1178-90.
14. Ciechanover, A. and Ben-Saadon, R. (2004) 'N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in', *Trends Cell Biol*, 14(3), pp. 103-6.
15. Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. L. and Hershko, A. (1980) 'ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(3), pp. 1365-8.
16. Cierpicki, T., Zhukov, I., Byrd, R. A. and Otlewski, J. (2002) 'Hydrogen bonds in human ubiquitin reflected in temperature coefficients of amide protons', *J Magn Reson*, 157(2), pp. 178-80.
17. Clague, M. J., Heride, C. and Urbe, S. (2015) 'The demographics of the ubiquitin system', *Trends Cell Biol*, 25(7), pp. 417-26.
18. Cope, G. A. and Deshaies, R. J. (2003) 'COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases', *Cell*, 114(6), pp. 663-71.
19. Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
20. Cutting, G. R. (2015) 'Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application', *Nat Rev Genet*, 16(1), pp. 45-56.
21. Davies, D. D. and Humphrey, T. J. (1978) 'Amino Acid recycling in relation to protein

- turnover', *Plant Physiol*, 61(1), pp. 54-8.
22. de Poot, S. A. H., Tian, G. and Finley, D. (2017) 'Meddling with Fate: The Proteasomal Deubiquitinating Enzymes', *J Mol Biol*, 429(22), pp. 3525-3545.
 23. Deshaies, R. J. (1999) 'SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, pp. 435-67.
 24. Deshaies, R. J. and Joazeiro, C. A. (2009) 'RING domain E3 ubiquitin ligases', *Annu Rev Biochem*, 78, pp. 399-434.
 25. Dixon, C., Brunson, L. E., Roy, M. M., Smothers, D., Sehorn, M. G. and Mathias, N. (2003) 'Overproduction of polypeptides corresponding to the amino terminus of the F-box proteins Cdc4p and Met30p inhibits ubiquitin ligase activities of their SCF complexes', *Eukaryot Cell*, 2(1), pp. 123-33.
 26. Duda, D. M., Borg, L. A., Scott, D. C., Hunt, H. W., Hammel, M. and Schulman, B. A. (2008) 'Structural insights into NEDD8 activation of cullin-RING ligases: conformational control of conjugation', *Cell*, 134(6), pp. 995-1006.
 27. Duda, D. M., Olszewski, J. L., Tron, A. E., Hammel, M., Lambert, L. J., Waddell, M. B., Mittag, T., DeCaprio, J. A. and Schulman, B. A. (2012) 'Structure of a glomulin-RBX1-CUL1 complex: inhibition of a RING E3 ligase through masking of its E2-binding surface', *Mol Cell*, 47(3), pp. 371-82.
 28. Ehrmann, M. and Clausen, T. (2004) 'Proteolysis as a regulatory mechanism', *Annu Rev Genet*, 38, pp. 709-24.
 29. Emberley, E. D., Mosadeghi, R. and Deshaies, R. J. (2012) 'Deconjugation of Nedd8 from Cul1 is directly regulated by Skp1-F-box and substrate, and the COP9 signalosome inhibits deneddylated SCF by a noncatalytic mechanism', *J Biol Chem*, 287(35), pp. 29679-89.
 30. Emmerich, C. H. and Cohen, P. (2015) 'Optimising methods for the preservation, capture and identification of ubiquitin chains and ubiquitylated proteins by immunoblotting', *Biochem Biophys Res Commun*, 466(1), pp. 1-14.
 31. Enchev, R. I., Scott, D. C., da Fonseca, P. C., Schreiber, A., Monda, J. K., Schulman, B. A., Peter, M. and Morris, E. P. (2012) 'Structural basis for a reciprocal regulation between SCF and CSN', *Cell Rep*, 2(3), pp. 616-27.
 32. Eskelinen, E. L. and Saftig, P. (2009) 'Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease', *Biochim Biophys Acta*, 1793(4), pp. 664-73.
 33. Fang, S. and Weissman, A. M. (2004) 'A field guide to ubiquitylation', *Cell Mol Life Sci*, 61(13), pp. 1546-61.
 34. Friedli, M., Nikolaev, S., Lyle, R., Arcangeli, M., Duboule, D., Spitz, F. and Antonarakis, S. E. (2008) 'Characterization of mouse Dactylaplasia mutations: a model for human ectrodactyly SHFM3', *Mamm Genome*, 19(4), pp. 272-8.
 35. Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002) 'The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction', *Physiol Rev*, 82(2), pp. 373-428.
 36. Goldberg, A. L. and St John, A. C. (1976) 'Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2', *Annu Rev Biochem*, 45, pp. 747-803.
 37. Goldenberg, S. J., Cascio, T. C., Shumway, S. D., Garbutt, K. C., Liu, J., Xiong, Y. and Zheng, N. (2004) 'Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases', *Cell*, 119(4), pp. 517-28.
 38. Greer, P. L., Hanayama, R., Bloodgood, B. L., Mardinly, A. R., Lipton, D. M., Flavell, S. W., Kim, T. K., Griffith, E. C., Waldon, Z., Maehr, R., Ploegh, H. L., Chowdhury, S., Worley, P. F., Steen, J. and Greenberg, M. E. (2010) 'The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc', *Cell*, 140(5), pp. 704-16.
 39. Groothuis, T. A., Dantuma, N. P., Neefjes, J. and Salomons, F. A. (2006) 'Ubiquitin crosstalk

- connecting cellular processes', *Cell Div*, 1, pp. 21.
40. Gstaiger, M., Marti, A. and Krek, W. (1999) 'Association of human SCF(SKP2) subunit p19(SKP1) with interphase centrosomes and mitotic spindle poles', *Exp Cell Res*, 247(2), pp. 554-62.
 41. Gurrieri, F., Prinós, P., Tackels, D., Kilpatrick, M. W., Allanson, J., Genuardi, M., Vuckov, A., Nanni, L., Sangiorgi, E., Garofalo, G., Nunes, M. E., Neri, G., Schwartz, C. and Tsipouras, P. (1996) 'A split hand-split foot (SHFM3) gene is located at 10q24-->25', *Am J Med Genet*, 62(4), pp. 427-36.
 42. Haglund, K. and Dikic, I. (2005) 'Ubiquitylation and cell signaling', *Embo j*, 24(19), pp. 3353-9.
 43. Hanna, J., Guerra-Moreno, A., Ang, J. and Micoogullari, Y. (2019) 'Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease', *Am J Pathol*, 189(1), pp. 94-103.
 44. Hao, B., Oehlmann, S., Sowa, M. E., Harper, J. W. and Pavletich, N. P. (2007) 'Structure of a Fbw7-Skp1-cyclin E complex: multisite-phosphorylated substrate recognition by SCF ubiquitin ligases', *Mol Cell*, 26(1), pp. 131-43.
 45. Hershko, A. and Ciechanover, A. (1992) 'The ubiquitin system for protein degradation', *Annu Rev Biochem*, 61, pp. 761-807.
 46. Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) 'The ubiquitin system', *Annu Rev Biochem*, 67, pp. 425-79.
 47. Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A. L. and Rose, I. A. (1980) 'Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(4), pp. 1783-6.
 48. Hershko, A., Ciechanover, A. and Rose, I. A. (1979) 'Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(7), pp. 3107-10.
 49. Hershko, A., Heller, H., Elias, S. and Ciechanover, A. (1983) 'Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown', *J Biol Chem*, 258(13), pp. 8206-14.
 50. Hill, R. L. (1965) 'Hydrolysis of proteins', *Adv Protein Chem*, 20, pp. 37-107.
 51. Hipp, M. S., Park, S. H. and Hartl, F. U. (2014) 'Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases', *Trends Cell Biol*, 24(9), pp. 506-14.
 52. Holder-Espinasse, M., Jamsheer, A., Escande, F., Andrieux, J., Petit, F., Sowinska-Seidler, A., Socha, M., Jakubiuk-Tomaszuk, A., Gerard, M., Mathieu-Dramard, M., Cormier-Daire, V., Verloes, A., Toutain, A., Plessis, G., Jonveaux, P., Baumann, C., David, A., Farra, C., Colin, E., Jacquemont, S., Rossi, A., Mansour, S., Ghali, N., Moncla, A., Lahiri, N., Hurst, J., Pollina, E., Patch, C., Ahn, J. W., Valat, A. S., Mezel, A., Bourgeot, P., Zhang, D. and Manouvrier-Hanu, S. (2019) 'Duplication of 10q24 locus: broadening the clinical and radiological spectrum', *Eur J Hum Genet*, 27(4), pp. 525-534.
 53. Hsia, E. Y., Gui, Y. and Zheng, X. (2015) 'Regulation of Hedgehog signaling by ubiquitination', *Front Biol (Beijing)*, 10(3), pp. 203-220.
 54. Huang, T. T. and D'Andrea, A. D. (2006) 'Regulation of DNA repair by ubiquitylation', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5), pp. 323-34.
 55. Huber, L. A. and Teis, D. (2016) 'Lysosomal signaling in control of degradation pathways', *Curr Opin Cell Biol*, 39, pp. 8-14.
 56. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S. and Howley, P. M. (1995) 'A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11), pp. 5249.
 57. Ianakiev, P., Kilpatrick, M. W., Dealy, C., Kosher, R., Korenberg, J. R., Chen, X. N. and Tsipouras, P. (1999) 'A novel human gene encoding an F-box/WD40 containing protein

- maps in the SHFM3 critical region on 10q24', *Biochem Biophys Res Commun*, 261(1), pp. 64-70.
58. Jensen, T. J., Loo, M. A., Pind, S., Williams, D. B., Goldberg, A. L. and Riordan, J. R. (1995) 'Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing', *Cell*, 83(1), pp. 129-35.
 59. Jentsch, S. and Pyrowolakis, G. (2000) 'Ubiquitin and its kin: how close are the family ties?', *Trends Cell Biol*, 10(8), pp. 335-42.
 60. Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R. C., Elledge, S. J., Pagano, M. and Harper, J. W. (2004) 'Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins', *Genes Dev: Vol. 21*. United States, pp. 2573-80.
 61. Katzmann, D. J., Odorizzi, G. and Emr, S. D. (2002) 'Receptor downregulation and multivesicular-body sorting', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(12), pp. 893-905.
 62. Khaminets, A., Behl, C. and Dikic, I. (2016) 'Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy', *Trends Cell Biol*, 26(1), pp. 6-16.
 63. Kiel, C. and Serrano, L. (2006) 'The ubiquitin domain superfold: structure-based sequence alignments and characterization of binding epitopes', *J Mol Biol*, 355(4), pp. 821-44.
 64. Kipreos, E. T. and Pagano, M. (2000) 'The F-box protein family', *Genome Biol*, 1(5), pp. Reviews3002.
 65. Kirkin, V. and Dikic, I. (2007) 'Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling', *Curr Opin Cell Biol*, 19(2), pp. 199-205.
 66. Kitagawa, K., Kotake, Y. and Kitagawa, M. (2009) 'Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products', *Cancer Sci*, 100(8), pp. 1374-81.
 67. Kleiger, G. and Mayor, T. (2014) 'Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system', *Trends Cell Biol*, 24(6), pp. 352-9.
 68. Labbadia, J. and Morimoto, R. I. (2015) 'The biology of proteostasis in aging and disease', *Annu Rev Biochem*, 84, pp. 435-64.
 69. Lee, J. and Zhou, P. (2007) 'DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase', *Mol Cell*, 26(6), pp. 775-80.
 70. Li, D. and Roberts, R. (2001) 'WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases', *Cell Mol Life Sci*, 58(14), pp. 2085-97.
 71. Li, W. and Ye, Y. (2008) 'Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms', *Cell Mol Life Sci*, 65(15), pp. 2397-406.
 72. Liu, Z. and Barrett, E. J. (2002) 'Human protein metabolism: its measurement and regulation', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283(6), pp. E1105-12.
 73. Lockwood, W. W., Chandel, S. K., Stewart, G. L., Erdjument-Bromage, H. and Beverly, L. J. (2013) 'The novel ubiquitin ligase complex, SCF(Fbxw4), interacts with the COP9 signalosome in an F-box dependent manner, is mutated, lost and under-expressed in human cancers', *PLoS One*, 8(5), pp. e63610.
 74. Lydeard, J. R., Schulman, B. A. and Harper, J. W. (2013) 'Building and remodelling
 75. Cullin-RING E3 ubiquitin ligases', *EMBO Rep*, 14(12), pp. 1050-61.
 76. Lyle, R., Radhakrishna, U., Blouin, J. L., Gagos, S., Everman, D. B., Gehrig, C., Delozier-Blanchet, C., Solanki, J. V., Patel, U. C., Nath, S. K., Gurrieri, F., Neri, G., Schwartz, C. E. and Antonarakis, S. E. (2006) 'Split-hand/split-foot malformation 3 (SHFM3) at 10q24, development of rapid diagnostic methods and gene expression from the region', *Am J Med Genet A*, 140(13), pp. 1384-95.
 77. Metzger, M. B., Hristova, V. A. and Weissman, A. M. (2012) 'HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance', *J Cell Sci*, 125(Pt 3), pp. 531-7.
 78. Metzger, M. B., Pruneda, J. N., Klevit, R. E. and Weissman, A. M. (2014) 'RING-type E3 ligases: master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination',

- Biochim Biophys Acta*, 1843(1), pp. 47-60.
79. Morimoto, M., Nishida, T., Honda, R. and Yasuda, H. (2000) 'Modification of cullin-1 by ubiquitin-like protein Nedd8 enhances the activity of SCF(skp2) toward p27(kip1)', *Biochem Biophys Res Commun*, 270(3), pp. 1093-6.
 80. Mukhopadhyay, D. and Riezman, H. (2007) 'Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling', *Science*, 315(5809), pp. 201-5.
 81. Muratani, M. and Tansey, W. P. (2003) 'How the ubiquitin-proteasome system controls transcription', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(3), pp. 192-201.
 82. Neefjes, J., Groothuis, T. A. and Dantuma, N. P. (2004) '[The 2004 Nobel Prize in Chemistry for the discovery of ubiquitin-mediated protein degradation]', *Ned Tijdschr Geneeskd*, 148(52), pp. 2579-82.
 83. Nunes, M. E., Pagon, R. A., Distèche, C. J. and Evans, J. P. (1994) 'A contiguous gene deletion syndrome at 7q21-q22 and implications for a relationship between isolated ectrodactyly and syndromic ectrodactyly', *Clin Dysmorphol*, 3(4), pp. 277-86.
 84. Ohh, M. (2006) 'Ubiquitin pathway in VHL cancer syndrome', *Neoplasia*, 8(8), pp. 623-9.
 85. Ohsumi, Y. (2001) 'Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(3), pp. 211-6.
 86. Ozkan, E., Yu, H. and Deisenhofer, J. (2005) 'Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by RING-type ubiquitin ligases', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52), pp. 18890-5.
 87. Pan, Z. Q., Kentsis, A., Dias, D. C., Yamoah, K. and Wu, K. (2004) 'Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction', *Oncogene*, 23(11), pp. 1985-97.
 88. Patton, E. E., Willems, A. R. and Tyers, M. (1998) 'Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis', *Trends Genet*, 14(6), pp. 236-43.
 89. Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. and Gygi, S. P. (2003) 'A proteomics approach to understanding protein ubiquitination', *Nat Biotechnol*, 21(8), pp. 921-6.
 90. Petroski, M. D. and Deshaies, R. J. (2005) 'Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1), pp. 9-20.
 91. Pickart, C. M. (2000) 'Ubiquitin in chains', *Trends Biochem Sci*, 25(11), pp. 544-8.
 92. Pickart, C. M. and Eddins, M. J. (2004) 'Ubiquitin: structures, functions, mechanisms', *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3), pp. 55-72.
 93. Pierce, N. W., Lee, J. E., Liu, X., Sweredoski, M. J., Graham, R. L., Larimore, E. A., Rome, M., Zheng, N., Clurman, B. E., Hess, S., Shan, S. O. and Deshaies, R. J. (2013) 'Cand1 promotes assembly of new SCF complexes through dynamic exchange of F box proteins', *Cell*, 153(1), pp. 206-15.
 94. Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J. L., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B. and Peter, M. (2003) 'The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase', *Nature*, 425(6955), pp. 311-6.
 95. Podust, V. N., Brownell, J. E., Gladysheva, T. B., Luo, R. S., Wang, C., Coggins, M. B., Pierce, J. W., Lightcap, E. S. and Chau, V. (2000) 'A Nedd8 conjugation pathway is essential for proteolytic targeting of p27Kip1 by ubiquitination', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(9), pp. 4579-84.
 96. Ravid, T. and Hochstrasser, M. (2008) 'Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(9), pp. 679-90.
 97. Read, M. A., Brownell, J. E., Gladysheva, T. B., Hottelot, M., Parent, L. A., Coggins, M. B., Pierce, J. W., Podust, V. N., Luo, R. S., Chau, V. and Palombella, V. J. (2000) 'Nedd8 modification of cul-1 activates SCF(beta(TrCP))-dependent ubiquitination of IkappaBalpha', *Mol Cell Biol*, 20(7), pp. 2326-33.

98. Richardson, K. S. and Zundel, W. (2005) 'The emerging role of the COP9 signalosome in cancer', *Mol Cancer Res*, 3(12), pp. 645-53.
99. Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N. and et al. (1989) 'Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping', *Science*, 245(4922), pp. 1059-65.
100. Rosenberg, A. Z. and Kopp, J. B. (2017a) 'Focal Segmental Glomerulosclerosis', *Clin J Am Soc Nephrol*, 12(3), pp. 502-517.
101. Rosenberg, A. Z. and Kopp, J. B. (2017b) 'Focal Segmental Glomerulosclerosis', *Clin J Am Soc Nephrol*, 12(3), pp. 502-517.
102. Saha, A. and Deshaies, R. J. (2008) 'Multimodal activation of the ubiquitin ligase SCF by Nedd8 conjugation', *Mol Cell*, 32(1), pp. 21-31.
103. Saifee, N. H. and Zheng, N. (2008) 'A ubiquitin-like protein unleashes ubiquitin ligases', *Cell*, 135(2), pp. 209-11.
104. Sakamoto, K. M. (2002) 'Ubiquitin-dependent proteolysis: its role in human diseases and the design of therapeutic strategies', *Mol Genet Metab*, 77(1-2), pp. 44-56.
105. Schmalzer, T. and Dubiel, W. (2010) 'Control of Deneddylation by the COP9 Signalosome', *Subcell Biochem*, 54, pp. 57-68.
106. Schnell, J. D. and Hicke, L. (2003) 'Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins', *J Biol Chem*, 278(38), pp. 35857-60.
107. Schulman, B. A., Carrano, A. C., Jeffrey, P. D., Bowen, Z., Kinnucan, E. R., Finnin, M. S., Elledge, S. J., Harper, J. W., Pagano, M. and Pavletich, N. P. (2000a) 'Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex', *Nature*, 408(6810), pp. 381-6.
108. Schulman, B. A., Carrano, A. C., Jeffrey, P. D., Bowen, Z., Kinnucan, E. R., Finnin, M. S., Elledge, S. J., Harper, J. W., Pagano, M. and Pavletich, N. P. (2000b) 'Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex', *Nature*, 408(6810), pp. 381-6.
109. Schwartz, D. C. and Hochstrasser, M. (2003) 'A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers', *Trends Biochem Sci*, 28(6), pp. 321-8.
110. Sidow, A., Bulotsky, M. S., Kerrebrock, A. W., Birren, B. W., Altshuler, D., Jaenisch, R., Johnson, K. R. and Lander, E. S. (1999) 'A novel member of the F-box/WD40 gene family, encoding dactylin, is disrupted in the mouse dactylaplasia mutant', *Nat Genet*, 23(1), pp. 104-7.
111. Sifakis, S., Basel, D., Ianakiev, P., Kilpatrick, M. and Tsiouras, P. (2001) 'Distal limb malformations: underlying mechanisms and clinical associations', *Clin Genet*, 60(3), pp. 165-72.
112. Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. and Neer, E. J. (1999) 'The WD repeat: a common architecture for diverse functions', *Trends Biochem Sci*, 24(5), pp. 181-5.
113. Song, L. and Luo, Z. Q. (2019) 'Post-translational regulation of ubiquitin signaling', *J Cell Biol*, 218(6), pp. 1776-1786.
114. Spratt, D. E., Wu, K., Kovacev, J., Pan, Z. Q. and Shaw, G. S. (2012) 'Selective recruitment of an E2~ubiquitin complex by an E3 ubiquitin ligase', *J Biol Chem*, 287(21), pp. 17374-85.
115. Sprenger-Mahr, H., Zitt, E., Soleiman, A. and Lhotta, K. (2016) 'Successful Treatment of Focal Segmental Glomerulosclerosis after Kidney Transplantation with Plasma Exchange and Abatacept in a Patient with Juvenile Rheumatoid Arthritis', *Case Rep Transplant*, 2016, pp. 7137584.
116. Sun, L. and Chen, Z. J. (2004) 'The novel functions of ubiquitination in signaling', *Curr Opin Cell Biol*, 16(2), pp. 119-26.
117. Suraweera, A., Munch, C., Hanssum, A. and Bertolotti, A. (2012) 'Failure of amino acid

- homeostasis causes cell death following proteasome inhibition', *Mol Cell*, 48(2), pp. 242-53.
118. Tanaka, K. (2009) 'The proteasome: overview of structure and functions', *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85(1), pp. 12-36.
 119. Tang, X., Orlicky, S., Lin, Z., Willems, A., Neculai, D., Ceccarelli, D., Mercurio, F., Shilton, B. H., Sicheri, F. and Tyers, M. (2007) 'Suprafacial orientation of the SCFCdc4 dimer accommodates multiple geometries for substrate ubiquitination', *Cell*, 129(6), pp. 1165-76.
 120. Tauriello, D. V. and Maurice, M. M. (2010) 'The various roles of ubiquitin in Wnt pathway regulation', *Cell Cycle*, 9(18), pp. 3700-9.
 121. Temtamy, S. A. and McKusick, V. A. (1978) 'The genetics of hand malformations', *Birth Defects Orig Artic Ser*, 14(3), pp. i-xviii, 1-619.
 122. Thompson, S. J., Loftus, L. T., Ashley, M. D. and Meller, R. (2008) 'Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate', *Curr Opin Pharmacol*, 8(1), pp. 90-5.
 123. Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E. and Cook, W. J. (1987) 'Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution', *J Mol Biol*, 194(3), pp. 531-44.
 124. Ward, C. L., Omura, S. and Kopito, R. R. (1995) 'Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway', *Cell*, 83(1), pp. 121-7.
 125. Weber, J., Polo, S. and Maspero, E. (2019) 'HECT E3 Ligases: A Tale With Multiple Facets', *Front Physiol*, 10, pp. 370.
 126. Wei, D. and Sun, Y. (2010) 'Small RING Finger Proteins RBX1 and RBX2 of SCF E3 Ubiquitin Ligases: The Role in Cancer and as Cancer Targets', *Genes Cancer*, 1(7), pp. 700-7.
 127. Weissman, A. M. (2001) 'Themes and variations on ubiquitylation', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(3), pp. 169-78.
 128. Welchman, R. L., Gordon, C. and Mayer, R. J. (2005) 'Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8), pp. 599-609.
 129. Welcker, M. and Clurman, B. E. (2007) 'Fbw7/hCDC4 dimerization regulates its substrate interactions', *Cell Div*, 2, pp. 7.
 130. Wenzel, D. M., Stoll, K. E. and Klevit, R. E. (2011) 'E2s: structurally economical and functionally replete', *Biochem J*, 433(1), pp. 31-42.
 131. Whitby, F. G., Xia, G., Pickart, C. M. and Hill, C. P. (1998) 'Crystal structure of the human ubiquitin-like protein NEDD8 and interactions with ubiquitin pathway enzymes', *J Biol Chem*, 273(52), pp. 34983-91.
 132. Willems, A. R., Schwab, M. and Tyers, M. (2004) 'A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin', *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3), pp. 133-70.
 133. Wu, K., Chen, A. and Pan, Z. Q. (2000) 'Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization', *J Biol Chem*, 275(41), pp. 32317-24.
 134. Wu, K., Fuchs, S. Y., Chen, A., Tan, P., Gomez, C., Ronai, Z. and Pan, Z. Q. (2000) 'The SCF(HOS/beta-TRCP)-ROC1 E3 ubiquitin ligase utilizes two distinct domains within CUL1 for substrate targeting and ubiquitin ligation', *Mol Cell Biol*, 20(4), pp. 1382-93.
 135. Xu, C. and Min, J. (2011) 'Structure and function of WD40 domain proteins', *Protein Cell*, 2(3), pp. 202-14.
 136. Yamoah, K., Oashi, T., Sarikas, A., Gazdoui, S., Osman, R. and Pan, Z. Q. (2008) 'Autoinhibitory regulation of SCF-mediated ubiquitination by human cullin 1's C-terminal tail', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(34), pp. 12230-5.
 137. Ye, Y. and Rape, M. (2009) 'Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(11), pp. 755-64.
 138. Zhang, C. and Zhang, F. (2015) 'The Multifunctions of WD40 Proteins in Genome Integrity and Cell Cycle Progression', *J Genomics*, 3, pp. 40-50.

139. Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Harper, J. W. and Pavletich, N. P. (2002a) 'Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex', *Nature*, 416(6882), pp. 703-9.
140. Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Harper, J. W. and Pavletich, N. P. (2002b) 'Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex', *Nature*, 416(6882), pp. 703-9.
141. Figure 12: <https://www.studyblue.com/notes/n/limb-development/deck/20467200>