

**Table des matières**

<b>Table des matières .....</b>	<b>1</b>
<b>Index des figures .....</b>	<b>4</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>6</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>A. L'ubiquitination .....</b>	<b>12</b>
1. L'ubiquitination .....	12
a. L'ubiquitine et les protéines ubiquitin-like (Ubl) .....	12
b. Le processus d'ubiquitination .....	13
c. La variabilité des modifications par l'ubiquitine .....	15
2. Les déubiquitinases .....	16
a. L'action des déubiquitinases .....	16
b. Les familles de déubiquitinases .....	18
<i>Les Ubiquitin Specific Proteases (USPs)</i> .....	19
<i>Les Ubiquitin C-terminal Hydrolases (UCHs)</i> .....	20
<i>Les Ovarian Tumor proteases (OTUs)</i> .....	20
<i>Les protéases Machado Joseph Disease (MJD)</i> .....	21
<i>Les métalloprotéases aux domaines JAB1/PAD1/MPN (JAMMs)</i> .....	21
c. La spécificité des DUBs .....	22
<i>La spécificité pour un type d'ubiquitination</i> .....	22
<i>La spécificité du substrat</i> .....	24
<i>La régulation des déubiquitinases</i> .....	25
3. Le destin des protéines ubiquitinées .....	28
<b>B. L'endocytose .....</b>	<b>31</b>
1. L'ubiquitination des récepteurs membranaires dans l'endocytose .....	31
2. Le processus d'endocytose .....	32
3. La machinerie ESCRT .....	34
4. Les protéines Rab .....	37
5. Les DUBs impliquées dans l'endocytose .....	39
a. AMSH .....	39
b. USP8/UBPY .....	42
c. Autres DUBs impliquées dans la régulation de l'endocytose des récepteurs .....	46

## Table des matières

---

<b>C. L'immunité.....</b>	<b>49</b>
1. Le système immunitaire.....	49
a. La réponse immunitaire .....	49
b. La reconnaissance du «non soi» .....	51
c. La réponse immunitaire chez la drosophile.....	53
2. Les voies de l'immunité.....	54
a. Les voies Toll de la drosophile et TLRs des mammifères .....	54
<i>Activation du ligand Spätzle chez la drosophile :</i> .....	55
<i>La voie Toll de la drosophile.....</i>	58
<i>La voie TLR chez les mammifères .....</i>	59
b. Les voies IMD de la drosophile et TNF-R des mammifères.....	62
c. La régulation par ubiquitination des voies Toll et IMD de drosophile .....	66
<i>L'ubiquitination dans la voie IMD.....</i>	66
<i>L'ubiquitination dans la voie Toll.....</i>	68
3. Les protéines PGRPs de la drosophile .....	69
a. Les protéines PGRP-SA et PGRP-SD.....	71
b. La protéine PGRP-LE.....	72
c. La protéine PGRP-LF .....	73
d. Le récepteur immunitaire PGRP-LC .....	74
4. L'endocytose des récepteurs immunitaires.....	77
a. Endocytose du récepteur TLR4 des mammifères.....	77
b. Endocytose des récepteurs TNF-R des mammifères .....	79
c. Endocytose du récepteur Toll de <i>Drosophila</i> .....	80
5. Immunité innée et pathologies .....	81
<b>Résultats .....</b>	<b>83</b>
<b>A. Le récepteur immunitaire PGRP-LC est régulé par ubiquitination et endocytose .....</b>	<b>85</b>
1. Démarche scientifique et résumé de l'article.....	85
2. Article Viargues <i>et al.</i> (en préparation) .....	89
3. Résultats complémentaires.....	117
a. Caractérisation de l'ubiquitination de PGRP-LC .....	117
b. Effet de l'extinction de <i>Usp8</i> , <i>Hrs</i> et <i>Rab5</i> sur la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC.....	119
c. Effet de l'extinction de <i>Usp8</i> , <i>Hrs</i> et <i>Rab5</i> sur l'internalisation de PGRP-LC .....	120

<b>B. Identification des USPs intervenant dans la voie IMD : l'ubiquitination différentielle de la protéine Imd régulent son activité et sa stabilité.....</b>	<b>122</b>
1. Résumé de l'article .....	122
2. Article Engel <i>et al.</i> (en préparation) .....	124
<b>C. USP2 hydrolyse les chaînes de poly-ubiquitine K48 de PGRP-LC .....</b>	<b>160</b>
1. Effet de l'extinction de <i>Usp2</i> , <i>Usp34</i> et <i>Usp36</i> sur l'ubiquitination de PGRP-LC .....	160
2. L'activité déubiquitinase de USP2 est nécessaire à l'hydrolyse des chaînes K48 de PGRP-LC .....	162
3. USP2 et PGRP-LC font partie d'un même complexe.....	164
4. La spécificité de la déubiquitinase USP2 .....	164
5. Effet de l'extinction de <i>Usp2</i> sur l'internalisation de PGRP-LC.....	165
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>169</b>
<b>A. Discussion et Perspectives.....</b>	<b>173</b>
1. L'ubiquitination de PGRP-LC .....	173
2. Caractérisation de l'endocytose de PGRP-LC .....	173
3. L'ubiquitination de PGRP-LC est-elle nécessaire à son internalisation ? .....	174
4. Rôle de USP2 dans le trafic endocytaire de PGRP-LC .....	175
5. L'endocytose est-elle nécessaire à la signalisation de la voie IMD ?.....	175
<b>B. Conclusion générale.....</b>	<b>177</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>179</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>205</b>
Annexe 1. Protocole d'immunofluorescence pour suivre l'internalisation du récepteur PGRP-LC .....	207
Annexe 2. Protocole pour la quantification de l'internalisation de PGRP-LC par cytométrie..	209
Annexe 3. Les systèmes «UAS-GAL4» et «UAS-GAL4, GAL80ts» .....	211
Annexe 4. Les transcrits du gène <i>PGRP-LC</i> et la séquence protéique de PGRP-LC RA (ou PGRP-LCx).....	214
Annexe 5. Taillebourg <i>et al.</i> , 2012. .....	216

**Index des figures**

<b>Figure 1. La réaction chimique d'ubiquitination.</b> .....	13
<b>Figure 2. Le mécanisme d'ubiquitination.</b> (Weissman, 2001) .....	14
<b>Figure 3. Les différentes modifications post-traductionnelles impliquant l'ubiquitine.</b> (Tokunaga and Iwai, 2012) .....	16
<b>Figure 4. Rôles principaux des déubiquitinases.</b> (Komander et al., 2009a) .....	18
<b>Figure 5. Structure des domaines catalytiques des cinq familles de déubiquitinases.</b> (Nijman et al., 2005) .....	19
<b>Figure 6. Différents niveaux de spécificité des déubiquitinases (DUBs).</b> (Komander et al., 2009a).....	27
<b>Figure 7. Différences de conformation entre des chaînes tétra-ubiquitine K48 et K63.</b> (Komander et al., 2009b).....	28
<b>Figure 8. Les fonctions des principales modifications par l'ubiquitine (Ub).</b> (Haglund and Dikic, 2005).....	30
<b>Figure 9. L'internalisation et le tri endocytaire.</b> (Raiborg and Stenmark, 2009).....	34
<b>Figure 10. Le tri endosomal des protéines ubiquitinées par la machinerie ESCRT.</b> (Raiborg and Stenmark, 2009) .....	37
<b>Figure 11. Le rôle des protéines Rab dans la régulation de l'endocytose.</b> (Stein et al., 2003).....	38
<b>Figure 12. Modèles du rôle de AMSH dans la régulation de la dégradation lysosomale des récepteurs.</b> (Sierra et al., 2010) .....	41
<b>Figure 13. Différents modèles du rôle de USP8 (ou UBPY) dans la régulation de l'endocytose.</b> (Clague and Urbe, 2006; Row et al., 2006).....	45
<b>Figure 14. Activation des mécanismes de défenses chez l'hôte.</b> (Medzhitov, 2007) .....	53
<b>Figure 15. Les cascades protéolytiques impliquées dans l'activation de Spätzle (Spz).</b> (Valanne et al., 2011) .....	57
<b>Figure 16. Comparaison entre la voie Toll de la drosophile et la voie des TLR dépendante de MyD88.</b> .....	61
<b>Figure 17. Comparaison entre la voie IMD de la drosophile et la voie du récepteur au TNF chez les mammifères.....</b>	65

## Index des figures

---

<b>Figure 18. Les structures des différents peptidoglycans.</b> (Kurata et al., 2006).....	76
<b>Figure 19. L'activation des voies de signalisation par TLR4 dépend de sa localisation cellulaire.</b> (McGettrick and O'Neill, 2010).....	78
<b>Figure 20. Principe du protocole d'immunofluorescence permettant de suivre l'internalisation du récepteur membranaire PGRP-LC.</b> .....	87
<b>Figure 21. La poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC ne le cible pas pour la dégradation protéasomale.</b> .....	118
<b>Figure 22. Les extinctions de <i>Usp8</i>, <i>Hrs</i> et <i>Rab5</i> entraînent une augmentation des formes ubiquitinées K48 de PGRP-LC.</b> .....	119
<b>Figure 23. Effet de l'extinction de <i>Usp8</i>, <i>Hrs</i> et <i>Rab5</i> sur l'internalisation de PGRP-LC.</b> .....	121
<b>Figure 24. Effet de l'extinction de <i>Usp2</i>, <i>Usp34</i> et <i>Usp36</i> sur l'ubiquitination de PGRP-LC.</b> .....	161
<b>Figure 25. USP2 diminue la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC, de façon dépendante de son activité catalytique.</b> .....	163
<b>Figure 26. USP2 interagit, directement ou à travers un complexe, avec les protéines Imd, PGRP-LC et Kenny.</b> (Résultats de D. Thevenon).....	164
<b>Figure 27. Effet de USP2 sur la totalité des protéines poly-ubiquitinées par des chaînes K48.</b> .....	165
<b>Figure 28. Effet de l'extinction de <i>Usp2</i> sur l'internalisation de PGRP-LC.</b> .....	167
<b>Figure 29. L'extinction de <i>Usp2</i> n'entraîne pas d'accumulation significative des protéines ubiquitinées dans le cytoplasme.</b> .....	168
<b>Figure 30. Modèle d'endocytose du récepteur immunitaire PGRP-LC.</b> .....	178
<b>Figure 31. Le système «UAS-GAL4».</b> .....	212
<b>Figure 32. Le système «UAS-GAL4, GAL80ts».</b> .....	213
<b>Figure 33. Carte des transcrits du gène <i>PGRP-LC</i> (CG4432).</b> .....	214
<b>Figure 34. Séquence protéique de PGRP-LCx.</b> .....	215

**Liste des abréviations**

<b>A-SMase</b>	Acid Sphingomyelinase
<b>AMP</b>	Antimicrobial Peptide
<b>AMSH</b>	Associated Molecule with the <b>SH3</b> domain of STAM
<b>APC</b>	Antigen-Presenting Cells
<b>Ap-UCH</b>	<i>Aplysia</i> UCH
<b>BAR</b>	<b>Bin1</b> , Amphiphysin, and <b>Rvs161/167p</b>
<b>Cbl</b>	Casitas <b>B</b> -lineage Lymphoma
<b>CCL2</b>	chemokine <b>C-C</b> motif <b>Ligand 2</b>
<b>CCV</b>	Clathrin Coated Vesicles
<b>Cezanne</b>	Cellular Zinc finger <b>Anti-NF-<math>\kappa</math>b</b>
<b>c.f.</b>	confer
<b>CHMP</b>	Charged Multivesicular <b>Body</b> Protein ou <b>CH</b> romatin <b>M</b> odifying <b>P</b> rotein
<b>c-IAP</b>	cellular Inhibitor of Apoptosis
<b>CXCR4</b>	<b>C-X-C</b> chemokine <b>R</b> eceptor <b>t</b> ype <b>4</b>
<b>CYLD</b>	<b>C</b> ylindromatosis
<b>DAP</b>	acide <i>méso</i> - <b>Diaminopimélique</b>
<b>DD</b>	<b>D</b> eath <b>D</b> omain
<b>DIAP2</b>	<b>D</b> rosophila <b>I</b> nhibitor of <b>A</b> poptosis <b>2</b>
<b>DIF</b>	<b>D</b> orsal-related <b>I</b> mmune <b>F</b> actor
<b>DISC</b>	<b>D</b> eath- <b>I</b> nducing <b>S</b> ignaling <b>C</b> omplex
<b>Doa4</b>	<b>D</b> egradation <b>O</b> f <b>A</b> lpha <b>4</b>
<b>DREDD</b>	<b>D</b> eath <b>R</b> elated <i>ced-3</i> / <b>Nedd2</b> -like <b>p</b> rotein
<b>dsRNA</b>	<b>d</b> ouble <b>s</b> trand <b>R</b> NA
<b>DUB</b>	<b>D</b> éubiquitinase ou <b>D</b> eubiquitinating <b>e</b> zyme
<b>e.g.</b>	<b>e</b> xempli <b>g</b> ratia
<b>EGF</b>	<b>E</b> pidermal <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
<b>EGFR</b>	<b>E</b> pidermal <b>G</b> rowth <b>F</b> actor <b>R</b> eceptor
<b>EPS15</b>	<b>E</b> Pidermal growth factor receptor <b>S</b> ubstrate <b>15</b>
<b>ESCRT</b>	<b>E</b> ndosomal <b>S</b> orting <b>C</b> omplex <b>R</b> equired for <b>T</b> ransport
<b>FADD</b>	<b>F</b> as <b>A</b> ssociated <b>v</b> ia <b>D</b> eath <b>D</b> omain
<b>Faf</b>	<b>F</b> At <b>F</b> acets
<b>Fig.</b>	<b>F</b> igure
<b>GDP</b>	<b>G</b> uanosine <b>D</b> i <b>P</b> hosphate
<b>GNBP</b>	<b>G</b> ram- <b>N</b> egative <b>B</b> inding <b>P</b> rotein <b>3</b>
<b>GRASS</b>	<b>G</b> ram- <b>P</b> ositive- <b>S</b> pecific <b>S</b> erine <b>p</b> rotease
<b>GDP</b>	<b>G</b> uanosine <b>D</b> iphosphate
<b>GTP</b>	<b>G</b> uanosine <b>T</b> riphosphate

## Liste des abréviations

<b>HD-PTP/PTPN23</b>	His Domain Protein Tyrosin Phospatase/Protein Tyrosine Pospatase type N23
<b>HECT</b>	Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus
<b>Hrs</b>	HGF-regulated tyrosine kinase substrate
<b>I-κB</b>	Inhibitory κB
<b>IBM</b>	IAP-Binding Motif
<b>IFN</b>	Interféron
<b>IFNR1</b>	IFN- $\alpha/\beta$ Receptor 1
<b>IKK</b>	IκB Kinase
<b>IL-1</b>	Interleukin-1
<b>IL-1R</b>	Interleukin-1 Receptor
<b>ILV</b>	IntraLuminal Vesicles
<b>IMD</b>	Immune Deficiency
<b>IRAK</b>	IL-1R-Associated Kinase
<b>ird</b>	immune response deficient
<b>ISG15</b>	Interferon-Stimulated Gene 15
<b>JAMM</b>	JAB1/PAD1/MPN-domain-containing Metalloenzyme
<b>JNK</b>	Jun N-terminal Kinase
<b>LAMP1</b>	Lysosomal Associated Membrane Protein 1
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>Lqf</b>	LiQuid Facets
<b>LUBAC</b>	Linear Ubiquitin Assembly Complex
<b>MALT1</b>	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue 1
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MDM2</b>	Murine Double Minute-2
<b>ModSP</b>	Modular Serine Protease
<b>MJD</b>	Machado Joseph Disease protease
<b>MVB ou MVE</b>	MultiVesicular Body ou MultiVesicular Endosome
<b>MyD88</b>	Myeloid Differentiation primary response gene 88
<b>NEDD8</b>	Neural cell-expressed, Developmentally Downregulated 8
<b>NEMO</b>	NF-κB Essential Modulator
<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor κB
<b>NLR</b>	NOD-Like Receptor
<b>NOD</b>	Nucleotide binding Oligomerization Domain
<b>NRDP1</b>	Neuregulin Receptor Degradation Protein-1
<b>OTU</b>	Ovarian Tumour proteases
<b>PAMP</b>	Pathogen-Associated Molecular Pattern
<b>PGN</b>	Peptidoglycane
<b>PGRP</b>	Peptidoglycan Recognition Protein
<b>PIMS</b>	PGRP-LC-interacting inhibitor of IMD Signaling
<b>POSH</b>	Plenty Of SH3
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptor
<b>Rab</b>	RAs related in Brain
<b>RFU1</b>	Regulator of Free Ubiquitin chains 1

## Liste des abréviations

---

<b>RHIM</b>	<b>RIP Homotypic Interaction Motif</b>
<b>RIG-I</b>	<b>Retinoic acid-Inducible Gene I</b>
<b>RING</b>	<b>Really Interesting New Gene</b>
<b>RIP1</b>	<b>Receptor Interacting Protein 1</b>
<b>RLR</b>	<b>RIG-I-Like Receptor</b>
<b>RNAi</b>	<b>ARN Interférent</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactive Oxygen Species</b>
<b>RPN11</b>	<b>Regulatory Particle Non-ATPase 11</b>
<b>RTK</b>	<b>Receptor Tyrosine Kinase</b>
<b>RYBP</b>	<b>Ring and YY1 Binding Protein</b>
<b>SCF</b>	<b>Skp1/Cullin/F-box</b>
<b>Spz</b>	<b>Spätzle</b>
<b>SH3</b>	<b>Src Homology 3</b>
<b>Skp1</b>	<b>S-phase kinase-associated protein 1</b>
<b>Smo</b>	<b>Smoothened</b>
<b>SPE</b>	<b>Spätzle-Processing Enzyme</b>
<b>STAM</b>	<b>Signal-Transducing Adaptor Molecule</b>
<b>SUMO</b>	<b>Small Ubiquitin-like Modifier</b>
<b>TAB</b>	<b>TAK1 Binding protein</b>
<b>TAK1</b>	<b>TGF<math>\beta</math> Activated Kinase 1</b>
<b>TCT</b>	<b>Tracheal Cytoxin</b>
<b>TGN</b>	<b>Trans-Golgi Network</b>
<b>TIR</b>	<b>Toll/IL-1R</b>
<b>TLR</b>	<b>Toll-Like Receptor</b>
<b>TNF</b>	<b>Tumor Necrosis Factor</b>
<b>TNF-R</b>	<b>Tumor Necrosis Factor Receptor</b>
<b>TRADD</b>	<b>TNF-R1-Associated Death Domain</b>
<b>TRAF</b>	<b>TNF Receptor-Associated Factor</b>
<b>TRID</b>	<b>TNF-R1 Internalization Domain</b>
<b>UAF1</b>	<b>USP1 Associated Factor 1</b>
<b>Ubc</b>	<b>Ubiquitin conjugating enzyme</b>
<b>UBD</b>	<b>Ubiquitin Binding Domain</b>
<b>Ubl</b>	<b>Ubiquitin like protein</b>
<b>UBP</b>	<b>Ubiquitin specific Protease</b>
<b>UBPY</b>	<b>UBiquitin specific Protease Y</b>
<b>UCH</b>	<b>Ubiquitin C-terminal Hydrolases</b>
<b>UIM</b>	<b>Ubiquitin Interacting Motif</b>
<b>USP</b>	<b>Ubiquitin Specific Protease</b>
<b>USP8</b>	<b>Ubiquitin Specific Protease 8</b>
<b>UEV1a</b>	<b>Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant 1a</b>
<b>Vps</b>	<b>Vacuolar protein sorting</b>
<b>WT</b>	<b>Wild Type</b>
<b>YopJ</b>	<b>Yersinia outer proteins J</b>

# Introduction

---

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



La survie des êtres vivants repose sur leur capacité à s'adapter à leur environnement. Cette adaptabilité s'observe également à l'échelle de la cellule. En effet, des récepteurs à la surface des cellules, dans le cytoplasme ou même dans le milieu extracellulaire détectent des changements environnementaux (e.g. infection, contraintes mécaniques, stress oxydatif, hormone, pour n'en citer qu'une infime partie). La détection de ces stimuli active des cascades de signalisation, qui induisent ou inhibent la transcription de gènes spécifiques ou modifient l'organisation de cytosquelette pour permettre des changements de morphologies cellulaires drastiques. Ainsi, ces modifications de la physiologie cellulaire vont permettre aux cellules de s'approprier leur nouveau micro-environnement et de fournir une réponse adaptée.

La signalisation cellulaire est un mécanisme finement régulé car, très souvent, les voies de signalisation doivent être maintenues en position «OFF» en condition basale et, au contraire, elles doivent être rapidement activées en réponse aux stimuli, puis à nouveau éteintes afin de retrouver leur condition d'équilibre. La rapidité de réaction repose notamment sur la réversibilité des modifications post-traductionnelles. En effet, les modifications post-traductionnelles permettent de réguler l'activité, la stabilité et la localisation subcellulaire des protéines. Ces modifications sont très diverses et consistent en l'ajout de groupes fonctionnels (e.g. la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation...) ou de peptides (e.g. l'ubiquitination, la sumoylation...) sur la protéine cible.

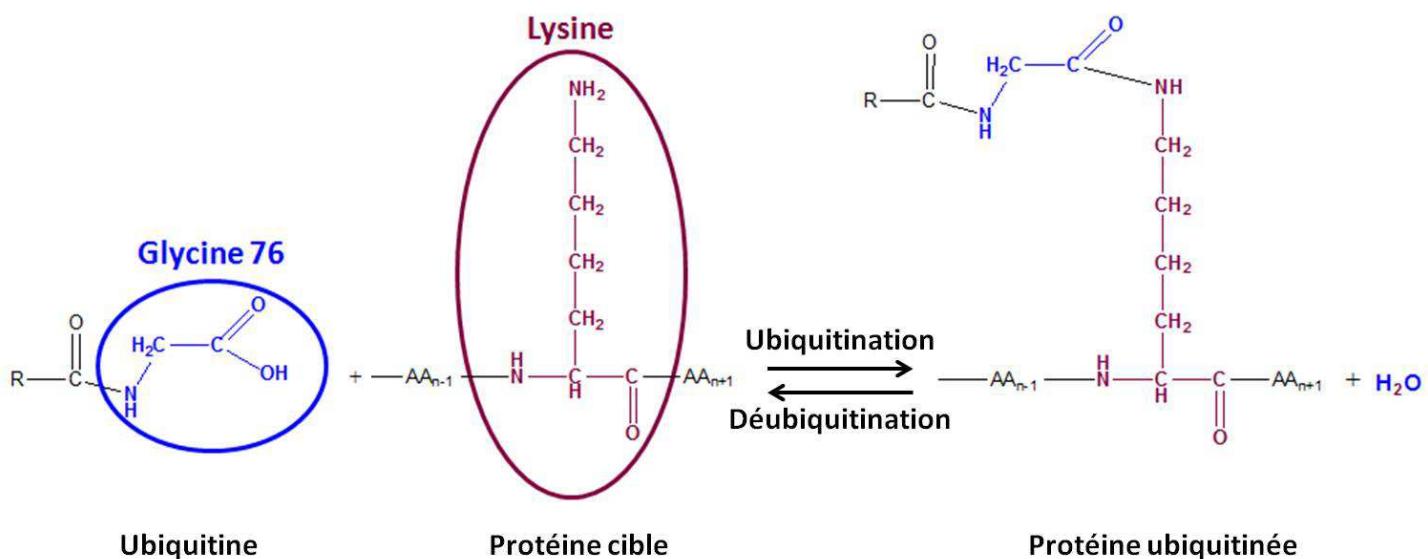
Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons exclusivement au rôle de l'ubiquitination dans la régulation de la réponse immunitaire et, plus particulièrement à son rôle dans l'endocytose du récepteur membranaire PGRP-LC, qui intervient dans la détection des pathogènes. Ensuite, nous éluciderons la fonction d'enzymes de déubiquitination dans la régulation des signaux en aval de ce récepteur.

## **A. L'ubiquitination**

### **1. L'ubiquitination**

#### **a. L'ubiquitine et les protéines ubiquitin-like (Ubl)**

L'ubiquitine (Ub) est un peptide de 76 acides aminés (8,5 kDa) présents chez les eucaryotes. Cette petite protéine a été très conservée au cours de l'évolution puisque seulement trois acides aminés diffèrent de la levure à l'Homme. L'ubiquitination, ou ubiquitylation, est le processus qui permet la liaison covalente et réversible de l'ubiquitine à un résidu lysine (K) des protéines cibles (Fig. 1) Au même titre que la phosphorylation, l'ubiquitination intervient dans la majorité des processus cellulaires, comme la dégradation des protéines par le protéasome, l'endocytose des récepteurs et l'activation des protéines (Haglund and Dikic, 2005; Herrmann et al., 2007). Bien que l'ubiquitine ne soit présente que chez les eucaryotes, la superfamille des protéines Ubl (Ubiquitin like) se retrouve dans tout le règne du vivant (Maupin-Furlow, 2013). Les Ubl n'ont pas d'homologie de séquence particulière avec l'ubiquitine, mais elles présentent une structure tridimensionnelle commune et un résidu glycine en C-terminal, dont le groupe carboxyle est le site de liaison au résidu lysine des substrats par la formation d'une liaison isopeptidique (Herrmann et al., 2007). Chez les eucaryotes, les protéines Ubl, tout comme l'ubiquitine, sont impliquées dans de nombreux processus biologiques, comme la dégradation protéasomale ou vacuolaire, l'autophagie, la régulation transcriptionnelle ou la progression du cycle cellulaire (Vierstra, 2012). Chez les procaryotes, les protéines Ubl sont principalement impliquées dans le transfert du soufre. La première protéine Ubl caractérisée en cellules de mammifères est ISG15 (Interferon-Stimulated Gene 15), qui ressemble à un dimère d'ubiquitine (Loeb and Haas, 1994). De plus, cette famille comprend aussi, entre autres, les protéines NEDD88 (Neural cell-expressed, Developmentally Downregulated 8) et SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) (van der Veen and Ploegh, 2012). Par la suite, nous nous intéresserons exclusivement aux modifications impliquant l'ubiquitine.

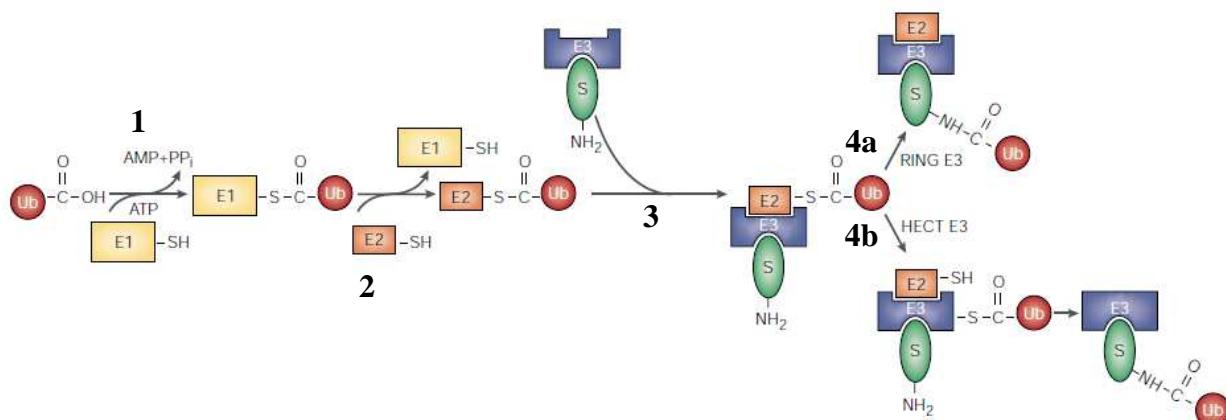


**Figure 1. La réaction chimique d'ubiquitination.** Au cours de l'ubiquitination, une liaison isopeptidique est formée entre le dernier acide aminé de l'ubiquitine (glycine 76) et un résidu lysine de la protéine cible. Il en résulte la formation d'une molécule d'eau. La déubiquitination est la réaction inverse, qui consiste en l'hydrolyse de la liaison isopeptidique. AA<sub>n-1</sub> et AA<sub>n+1</sub> représentent respectivement les acides aminés avant et après la lysine destinée à être ubiquitinée.

### b. Le processus d'ubiquitination

L'ubiquitination fait intervenir trois enzymes, qui vont agir séquentiellement pour permettre la liaison isopeptidique entre le dernier acide aminé de l'ubiquitine (glycine 76) et un résidu lysine de la protéine cible. D'abord, une enzyme «ubiquitin activating» E1 forme une liaison thioester avec la glycine terminale de l'ubiquitine. Cette réaction nécessite la consommation d'une molécule d'ATP et induit un changement conformationnel de l'ubiquitine du côté C-terminal, qui permet son activation. Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée sur une cystéine du site actif d'une enzyme «ubiquitin conjugating» E2. La liaison de E2 à l'ubiquitine permet de recruter une «ubiquitin ligase» E3. La E3 va finalement catalyser le transfert de l'ubiquitine activée de E2 à la protéine cible (Herrmann et al., 2007; Pickart and Eddins, 2004; Weissman, 2001) (Fig. 2). Les ligases E3 sont des protéines isolées ou des complexes multiprotéiques et sont réparties en deux classes. La première classe est distinguée par la présence d'un domaine HECT (Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus) et la deuxième par un domaine RING (Really Interesting New Gene) finger. Les E3 de type HECT participent à la réaction catalytique en formant une liaison thioester avec l'ubiquitine,

grâce à un résidu lysine conservé au sein du domaine HECT, et la transfère ensuite sur le substrat (Pickart, 2001). Ces E3 sont souvent formées par une seule grosse protéine. En outre, les E3 ligases de type RING sont de loin les plus abondantes dans la nature. Bien qu'elles n'aient aucune activité catalytique intrinsèque, elles coordonnent le transfert de l'ubiquitine sur le substrat, en s'associant aux ligases E2. Il est probable que ces E3s apportent la structure qui permet de rassembler le site actif de la E2 et la lysine acceptatrice du substrat (d'Azzo et al., 2005) (Fig. 2). L'ubiquitination de certaines protéines nécessite la présence d'une enzyme supplémentaire E4 qui favorise la formation de chaînes d'ubiquitine sur E3 (Hoppe, 2005), tandis que pour d'autres protéines possédant un domaine de liaison à l'ubiquitine (UBD), l'ubiquitination se fait sans l'intervention d'une E3 (Sorkin, 2007).



**Figure 2. Le mécanisme d'ubiquitination.** (1) L'ubiquitine libre est activée par la formation d'une liaison thioester entre l'enzyme «ubiquitin activating» E1 et le domaine C-terminal de l'ubiquitine. Cette réaction nécessite la consommation d'une molécule d'ATP. (2) L'ubiquitine est ensuite transférée à une enzyme «ubiquitin conjugating» E2. (3) E2 s'associe avec l'une des nombreuses «ubiquitin ligase» E3, qui a déjà lié ou non le substrat destiné à être ubiquitiné. (4a) Les E3 de type RING permettent le transfert direct de l'ubiquitine de la E2 au substrat. (4b) Au contraire, les E3 aux domaines HECT lient transitoirement l'ubiquitine avant son transfert au substrat. (Weissman, 2001)

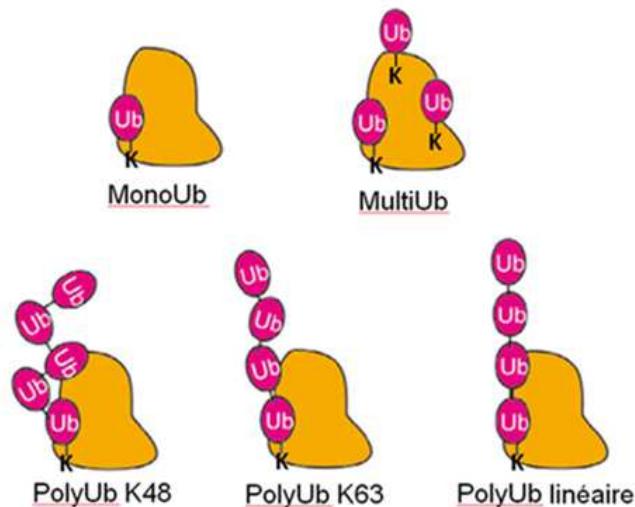
Ce système est construit comme une pyramide à la complexité accrue, puisque deux E1, trente-cinq E2 et plus de six cents E3 ont été identifiées chez l'Homme (Bhowmick et al., 2013). Ce sont donc les ligases E3 qui vont assurer la spécificité de la réaction, en sélectionnant et activant l'enzyme E2 appropriée et en recrutant le bon substrat. La dernière étape du processus d'ubiquitination est fortement régulée, par des interactions protéiques et

des modifications post-traductionnelles (d'Azzo et al., 2005). Les enzymes E2 sont elles-mêmes modifiées par les protéines Ubl SUMO (Pichler et al., 2005; Wolf et al., 2003). Toutes ces régulations vont assurer une bonne synchronisation, localisation et spécificité de la réaction d'ubiquitination. Cependant, les mécanismes permettant au complexe E2-E3 d'attacher un type d'ubiquitine précis à la lysine appropriée du substrat ne sont pas encore bien compris. Des études émergentes proposent que ce sont les caractéristiques structurales globales et celles du corps catalytique des enzymes E2 et E3, qui importent pour le positionnement optimal et l'ubiquitination de lysines spécifiques (Sadowski et al., 2012).

### c. La variabilité des modifications par l'ubiquitine

Plusieurs modifications post-traductionnelles sont effectuées à partir de l'ubiquitine (Fig. 3). La mono-ubiquitination correspond à l'attachement d'une seule molécule d'ubiquitine sur la protéine cible (Hoeller et al., 2006). De plus, plusieurs lysines d'une même protéine peuvent être modifiées par des mono-ubiquitines. On parle alors de multi-ubiquitination (Haglund et al., 2003). Par ailleurs, comme l'ubiquitine contient elle-même plusieurs résidus lysine, les molécules d'ubiquitine peuvent former différentes chaînes de poly-ubiquitine. Les sept résidus lysine (en position 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63) de l'ubiquitine sont donc, en théorie, susceptibles d'être impliqués dans la formation de chaînes de poly-ubiquitine (Weissman, 2001). Ce sont en tout premier lieu les chaînes d'ubiquitine K48 et K63 qui ont été mises en évidence ; puis, une étude de protéomique globale à partir de cellules de mammifères a montré que les chaînes K48 étaient les plus abondantes et que les sept résidus lysine de l'ubiquitine étaient impliqués dans la formation de chaînes de poly-ubiquitine (Kim et al., 2011). Plus récemment, des chaînes linéaires (ou M1) de poly-ubiquitine ont été mises en évidence chez les mammifères. Elles consistent en la liaison de la glycine 76 du côté N-terminal d'une molécule d'ubiquitine à la méthionine 1 du côté C-terminal d'une autre ubiquitine. Ce type de poly-ubiquitination est réalisé par un complexe E3 appelée LUBAC (Linear Ubiquitin Assembly Complex) (Emmerich et al., 2011; Tokunaga and Iwai, 2012). Le complexe LUBAC régule positivement la voie NF-κB, en ajoutant des chaînes linéaires d'ubiquitine sur les lysines 289 et 305 de la kinase NEMO (NF-κB Essential Modulator) (Tokunaga and Iwai, 2012).

Selon le type d'ubiquitination et la longueur des chaînes associés, les protéines cibles vont avoir différents destins, pouvant aller de l'activation à la dégradation protéasomale (Rahighi and Dikic, 2012). Ce point sera évoqué plus précisément dans le prochain chapitre «Le destin des protéines ubiquitinées».



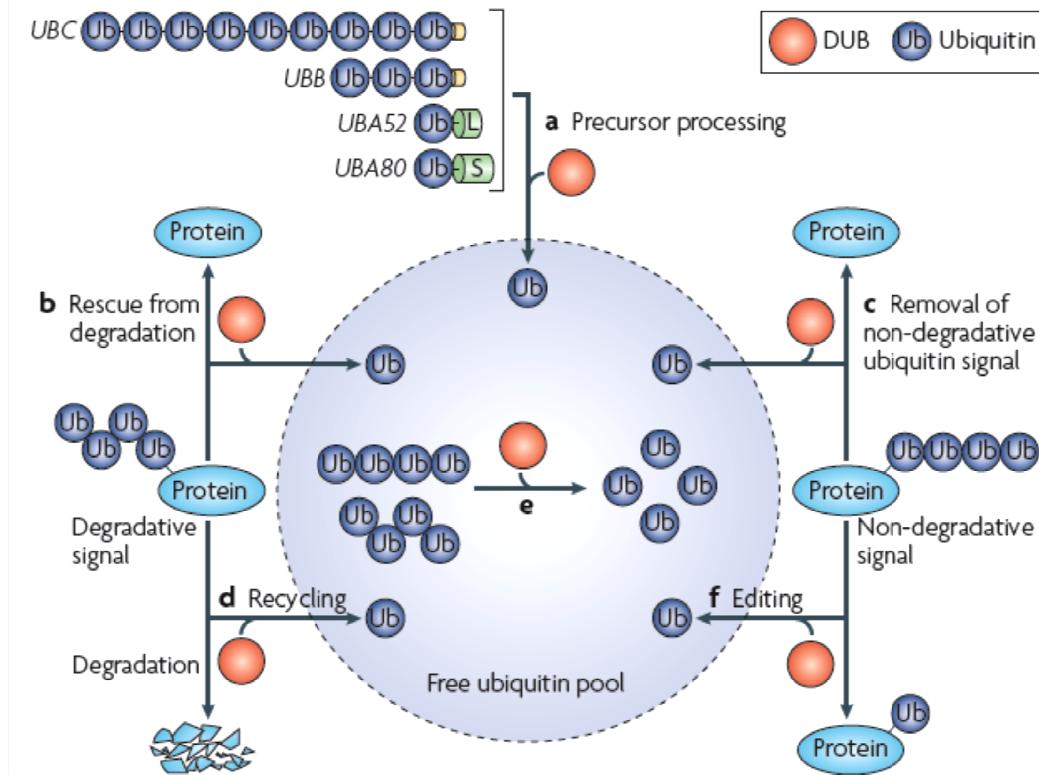
**Figure 3. Les différentes modifications post-traductionnelles impliquant l'ubiquitine.** L'attachement d'une seule ubiquitine (Ub) à une lysine (K) de la protéine cible correspond à la mono-ubiquitination (MonoUb). La multi-ubiquitination (MultiUb) résulte de la mono-ubiquitination de plusieurs résidus lysine. Comme l'ubiquitine possède elle-même plusieurs résidus lysine, une molécule d'ubiquitine peut en lier une autre pour former des chaînes de poly-ubiquitine (PolyUb). Selon la position de la lysine de l'ubiquitine impliquée dans la poly-ubiquitination, il existe différents types de poly-ubiquitination. Les plus étudiées sont la poly-ubiquitination K48 et K63, où les ubiquitines sont liées entre elles respectivement par leurs lysines 48 et 63. Les chaînes de polyUb linéaires consistent à l'assemblage d'une molécule d'ubiquitine sur le groupe amino-terminal d'une autre. (Tokunaga and Iwai, 2012)

## 2. Les déubiquitinases

### a. L'action des déubiquitinases

L'ubiquitination est un processus réversible, qui peut être inversé par l'action d'enzymes appelées déubiquitinases (DUBs). Les DUBs constituent un large groupe d'enzymes (environ 90 chez l'Homme) qui clivent la liaison à l'ubiquitine après le groupe carbonyle (C=O) du résidu glycine 76 (Amerik and Hochstrasser, 2004) (Fig. 1). Ces enzymes

assurent de nombreuses fonctions dans la cellule (Fig. 4). Tout d'abord, l'ubiquitine est exprimée sous forme de chaînes linéaires de poly-ubiquitine ou en fusion avec des protéines ribosomales (Komander et al., 2009a). L'action de certaines DUBs, comme celles de la famille des UCHs (Ubiquitin C-terminal Hydrolases), va donc permettre de générer de l'ubiquitine libre et activée à partir de ces précurseurs. Par ailleurs, l'ubiquitine peut complexer de façon inappropriée avec de petits éléments nucléophiles intracellulaires, comme les polyamines et la glutathione. Certaines DUBs interviennent alors pour dissocier l'ubiquitine de ces composants (Amerik and Hochstrasser, 2004). En outre, il a été remarqué que les cellules possédaient un pool constant d'ubiquitine (Haas and Bright, 1987; Swaminathan et al., 1999). Cela s'explique par le fait que certaines DUBs permettent la déubiquitination de protéines avant leur dégradation, ce qui conduit au recyclage de l'ubiquitine et, donc, au maintien de l'homéostasie de l'ubiquitine dans la cellule. Par exemple, le protéasome est associé à de nombreuses DUBs. Ces DUBs permettent, d'une part, de recycler l'ubiquitine avant la dégradation des substrats ubiquitinés. C'est le cas de ApUCH (Aplysia UCH), qui est associée au protéasome, et de la métalloprotéase Rpn11 (Regulatory Particle Non-ATPase 11) appartenant à la sous-unité 26S du protéasome (Berndt et al., 2002; Hegde et al., 1997). D'autre part, l'isopeptidase T des mammifères (ou Ubp14 chez la levure) dissocie les chaînes libres d'ubiquitine qui pourraient s'associer aux sites de liaison à l'ubiquitine du protéasome et entrer ainsi en compétition avec les substrats ubiquitinés destinés à la dégradation (Amerik and Hochstrasser, 2004; Hadari et al., 1992). Pour finir, les DUBs sont aussi un moyen de corriger spécifiquement l'ubiquitination d'une protéine et, par conséquent, de réguler le destin de la protéine cible dicté par le type d'ubiquitination associé. Dans ce cas, l'ubiquitine ligase E3 et la DUB partagent le même substrat et ont des actions opposées. Mais, il est aussi possible que l'enzyme E3 s'auto-ubiquitine et que certaines DUBs permettent de contrer cette modification (Clague et al., 2012a). A titre d'exemple, l'ubiquitine ligase MDM2 (Murine Double Minute-2) induit sa propre dégradation en s'auto-ubiquitinant par des chaînes K48 et USP2 stabilise la ligase en hydrolysant les polymères d'ubiquitine K48 (Stevenson et al., 2007).

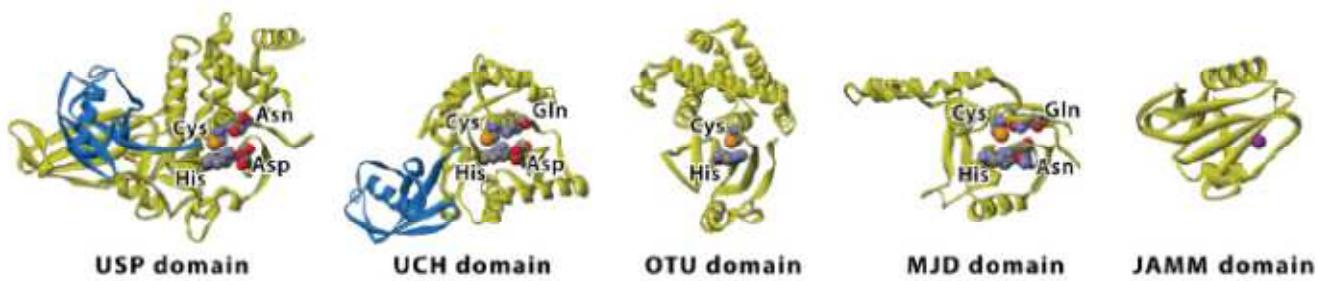


**Figure 4. Rôles principaux des déubiquitinases.** (a) L'ubiquitine (Ub) est codée par quatre gènes (*UBC*, *UBB*, *UBA52* et *UBA80*) qui sont exprimés sous forme de précurseurs d'ubiquitine. Ce sont des fusions linéaires qui consistent en plusieurs copies d'ubiquitine avec une extension en C-terminal (en jaune) ou d'une molécule d'ubiquitine fusionnée avec des protéines ribosomales (protéines ribosomales L40 (L) de la sous-unité 40S ou S27a (S) de la sous-unité 60S). Les déubiquitinases (DUBs) permettent la génération d'ubiquitine libre à partir de ces précurseurs. (b) L'ubiquitination étant parfois un signal de dégradation, les DUBs peuvent sauver les protéines de la dégradation en leur enlevant précocement les ubiquitines associées. (c) Les DUBs peuvent aussi changer le destin ou l'activité de protéines ubiquitinées. (d) Les DUBs ont un rôle crucial dans le maintien du stock d'ubiquitine libre. La déubiquitination des protéines avant leur dégradation permet de sauver l'ubiquitine de la protéolyse et de contribuer à la régénération du pool d'ubiquitine. (e) Le retrait de l'ubiquitine des substrats peut se faire d'un «seul bloc». Dans ce cas, les DUBs jouent un rôle dans le désassemblage des chaînes de poly-ubiquitine. (f) Quelques DUBs seraient capables de rogner les chaînes de poly-ubiquitine d'une protéine pour modifier leur topographie et, ainsi, échanger un type de signal par un autre. (Komander et al., 2009a)

### b. Les familles de déubiquitinases

Les déubiquitinases sont des protéases réparties en cinq familles selon leur structure (Fig. 5). La plus représentée est celle des Ubiquitin Specific Proteases (USPs), puisqu'elle comprend 55 membres chez l'Homme, soit plus de la moitié des déubiquitinases totales

(Clague et al., 2012a). Cette famille, tout comme celle des Ubiquitin C-terminal Hydrolases (UCHs), Ovarian Tumor proteases (OTUs) et celle des Machado Joseph Disease (MJD), sont des protéases à cystéine. L'activité enzymatique de ces protéases repose sur le groupement thiol d'une cystéine du site actif et résulte en la libération du substrat et par la formation d'un intermédiaire covalent entre la DUB et la molécule d'ubiquitine. Les protéases à cystéine sont caractérisées par trois résidus (cystéine, histidine et aspartate) qui forment la triade catalytique. D'autre part, les DUBs de la cinquième famille sont des métalloprotéases qui nécessitent la présence de l'ion  $Zn^{2+}$  et sont nommées JAB1/PAD1/MPN-domain-containing Metalloenzymes (JAMM). Contrairement aux protéases à cystéine, ces DUBs génèrent un intermédiaire non-covalent avec l'ubiquitine (Nijman et al., 2005).



**Figure 5. Structure des domaines catalytiques des cinq familles de déubiquitinases.** Les domaines catalytiques sont représentés en vert et l'ubiquitine en bleu. Ces domaines mettent en évidence la variabilité dans la structure secondaire des différentes classes de déubiquitinases. Les centres catalytiques sont représentés par des sphères de Van der Waals (carbone en gris, nitrogène en bleu, oxygène en rouge, souffre en orange et zinc en violet). Les déubiquitinases de la famille OTU ont une triade catalytique incomplète puisqu'elles ne possèdent pas le résidu aspartate dans leur site actif. (Nijman et al., 2005)

### Les Ubiquitin Specific Proteases (USPs)

Chez la levure, ces enzymes sont communément nommées UBP (Ubiquitin specific Proteases). De façon intéressante, le nombre de USPs a augmenté au cours de l'évolution, tout comme celui des ligases E3 (Semple, 2003), ce qui suggère une relation intime entre ces deux types d'enzymes. Malgré une faible similarité de séquence, les études structurales de six USPs montrent que le repliement du domaine USP est très conservé (Avvakumov et al., 2006; Hu et al., 2002; Hu et al., 2005; Komander et al., 2008; Renatus et al., 2006; Reyes-Turcu and

Wilkinson, 2009). L'activité catalytique des USPs repose sur des boîtes cystéine et histidine conservées. En revanche, le degré de conservation en dehors du site catalytique est faible, voire inexistant. Certaines USPs sont présentent sous une forme inactive et la liaison à l'ubiquitine va induire un changement conformationnel qui va les rendre actives (Komander et al., 2009a). Ce changement de conformation évite une activité pléiotropique et inappropriée sur l'ensemble des protéines, autres que l'ubiquitine.

### **Les Ubiquitin C-terminal Hydrolases (UCHs)**

La famille des UCHs comprend quatre protéines qui partagent une homologie proche dans leur domaine catalytique. Bien qu'elles aient été les premières décrites, leurs fonctions sont peu connues. Etant donnée leur structure renfermée, ces enzymes cliveraient généralement de petits substrats (Amerik and Hochstrasser, 2004). Ces UCHs joueraient un rôle dans le recyclage de l'ubiquitine conjuguée de façon inappropriée à des nucléophiles intracellulaires et dans l'hydrolyse de précurseurs d'ubiquitine (Larsen et al., 1998). UCH-L1 est impliquée dans la maladie de Parkinson et des maladies neurodégénératives (Liu et al., 2002). Par exemple, la mutation ponctuelle I93M de UCH-L1 entraîne une perte partielle de l'activité hydrolytique de UCH-L1 *in vitro* et a été associée à une forme familiale de la maladie de Parkinson (Leroy et al., 1998).

### **Les Ovarian Tumor proteases (OTUs)**

Cette famille tient son nom du premier gène *otu* (*ovarian tumor*) identifié chez la drosophile, qui est impliqué dans le développement des ovaires de la drosophile (Goodrich et al., 2004). Ensuite, une approche bioinformatique a conduit à l'identification de la famille des OTUs par homologie de séquence avec le gène *otu* (Makarova et al., 2000). Les protéines de la famille des OTUs ont d'abord été identifiées comme des déubiquitinases putatives, bien qu'elles n'aient pas d'homologie de séquence avec les DUBs connues (Balakirev et al., 2003). L'histidine et la cystéine du site actif sont conservées mais le troisième résidu nécessaire à la triade catalytique n'a pas été identifié (Nanao et al., 2004). Pourtant, des études plus récentes ont confirmé que certaines OTUs possédaient bien une activité déubiquitinase *in vitro* (Reyes-Turcu and Wilkinson, 2009). Comme les USPs, les OTUs sont présentes sous une forme

inactive et la liaison à l'ubiquitine va leur donner une conformation active (Edelmann et al., 2009).

### **Les protéases Machado Joseph Disease (MJD)**

Les déubiquitinases MJD sont composées d'une trentaine de protéines (Scheel et al., 2003). La plus étudiée est l'ataxin 3, dont la mutation est associée à la maladie neurodégénérative et héréditaire Machado-Joseph (Riess et al., 2008). En effet, cette pathologie est causée par l'expansion des motifs répétés CAG (codant pour la glutamine) dans le gène *ataxin 3* et la variabilité clinique du phénotype dépend de la taille de cette répétition (Riess et al., 2008). La répétition de CAG dans le gène *ataxin 3* entraîne un mauvais repliement de la protéine, ce qui cause la formation d'agrégats toxiques pour la cellule (Kawaguchi et al., 1994). Par ailleurs, l'activité catalytique de l'ataxin 3 a été observée *in vitro* (Burnett et al., 2003). Son domaine catalytique a peu d'homologie de séquence avec celui des autres DUBs connues, mais l'arrangement général de la triade catalytique est conservé (Mao et al., 2005). Aucun homologue n'a été identifié chez la levure, ce qui suggère que l'apparition des protéines MJD s'est fait tardivement au cours de l'évolution (Nijman et al., 2005).

### **Les métalloprotéases aux domaines JAB1/PADI/MPN (JAMMs)**

Les métalloprotéases JAMMs sont présentes dans tout le règne du vivant y compris dans le monde bactérien, bien que les bactéries ne possèdent pas de molécules d'ubiquitine. Cela sous-entend que les domaines JAMMs ont adopté une activité déubiquitinase sous la pression de l'évolution et qu'il est possible que certaines JAMMs ne possèdent pas d'activité DUB. Il est aussi probable que les JAMMs bactériennes aient une activité déubiquitinase et ciblent ainsi les molécules eucaryotes au cours de l'infection. Par exemple, le facteur de virulence YopJ (*Yersinia outer proteins J*), une cystéine protéase de *Yersinia pseudotuberculosis*, est sécrété dans les cellules humaines par le système bactérien de sécrétion de type III et il va réguler négativement les voies immunitaires NF-κB en déubiquitinant des protéines de la voie, comme TRAF2, TRAF6 et I-κBα (Zhou et al., 2005a). Par ailleurs, le motif JAMM possède deux résidus histidine et aspartate très conservés, qui chélatent l'ion Zn<sup>2+</sup> important pour l'activité protéolytique (Komander et al., 2009a). Il est

intéressant de noter que les JAMMs sont souvent associées à de gros complexes protéiques. Par exemple, Rpn11/POH1 est une déubiquitinase JAMM associée à la sous-unité 26S du protéasome, où elle clive les chaînes d'ubiquitine liées aux protéines destinées à la dégradation (Yao and Cohen, 2002). En outre, la déubiquitinase AMSH (Associated Molecule with the SH3 domain of STAM), dont on discutera plus en détail dans la partie «Endocytose» de ce manuscrit, est associée à la machinerie ESCRT de la voie endocytaire (McCullough et al., 2006).

### c. La spécificité des DUBs

Le génome humain code pour 90 DUBs, dont 76 sont probablement actives d'un point de vue enzymatique, d'après l'examen *in silico* de la séquence de leur domaine catalytique (Clague et al., 2012a). Or, les ubiquitine ligases E3 seraient d'environ 600 et les substrats probablement en plus grand nombre encore (les protéines ubiquitinées sont estimées à plus de 5000), ce qui pose la question de la spécificité des substrats pour les déubiquitinases (Bhowmick et al., 2013; Zhuang et al., 2013). Ces enzymes possèdent une spécificité variable à deux niveaux (Fig. 6) : au niveau du type d'ubiquitination et du substrat ubiquitiné. Il est très probable que ce soit la combinaison de la reconnaissance de la cible avec son ubiquitine ou sa chaîne d'ubiquitine associée qui confère la spécificité d'action de chaque DUB. D'autres mécanismes, comme la localisation et l'interaction avec des partenaires, peuvent aussi entrer en jeu pour assurer une spécificité de substrat pour chaque type cellulaire.

### La spécificité pour un type d'ubiquitination

Tout d'abord, certaines DUBs montrent une discrimination ubiquitine *versus* Ubl. Cette discrimination reposerait sur la partie C-terminale de l'ubiquitine, qui se différencie des autres Ubl. Plus particulièrement, des travaux biochimiques ont montré que les résidus arginine 74 et glycine 75 de l'ubiquitine étaient déterminants pour la reconnaissance de l'ubiquitine par les DUBs (Drag et al., 2008). Bien que ISG15 soit une Ubl avec la même séquence C-terminale que l'ubiquitine, USP18 peut cliver des fusions linéaires de ISG15 mais pas d'ubiquitines (Malakhov et al., 2002). *A contrario*, des OTUs virales peuvent hydrolyser à la fois ISG15 et l'ubiquitine des protéines cellulaires (Frijs-Staheli et al., 2007). Ainsi, la spécificité d'une

DUB pour une molécule est très variable et nos connaissances actuelles sur les motifs ou les résidus responsables de la distinction de l'ubiquitine au détriment des Ubl sont limitées.

Selon le branchement, la conformation des chaînes de poly-ubiquitine diffèrent dans leur conformation (Varadan et al., 2004). En effet, les chaînes K48 adoptent une conformation refermée et compacte, alors que les chaînes K63 et linéaires sont plus étendues (Komander et al., 2009b) (Fig. 7). En outre, la queue C-terminale de l'ubiquitine est flexible, ce qui apporte une variabilité supplémentaire dans la conformation des chaînes d'ubiquitine (Rahighi and Dikic, 2012). Cela suggère donc que certaines DUBs agissent sur des chaînes spécifiques *via* la reconnaissance conformationnelle des chaînes d'ubiquitine. Par exemple, la discrimination d'une déubiquitinase pour un type d'ubiquitination particulier a été observée avec la DUB endosomale AMSH. En effet, cette enzyme de la famille des JAMM hydrolyse les chaînes d'ubiquitine K63 mais pas les K48 *in vitro* (McCullough et al., 2006). Toutes les DUBs ne montrent pas une telle préférence pour une ubiquitination par rapport aux autres et, dans une même famille de DUBs, la spécificité vis-à-vis d'une chaîne de poly-ubiquitine diffère. Par exemple, USP8 hydrolyse indifféremment les chaînes K48 et K63 *in vitro*, alors que USP14 semble spécifique des chaînes K48 (Hu et al., 2005; Row et al., 2006). Néanmoins, il est important de noter que la préférence *in vivo* peut différer de celle observée *in vitro* car elle dépend des interactions spécifiques des DUBs. A titre d'exemple, l'équipe a observé que la déubiquitinase d'USP36 de la drosophile est capable d'hydrolyser les chaînes tétra-ubiquitine K48 et K63 *in vitro*, alors qu'elle hydrolyse les chaînes K63, mais pas les chaînes K48, associées à Imd *in vivo* (Thevenon et al., 2009).

D'autre part, certains domaines parfois présents chez les DUBs, autres que le site catalytique, participent à la reconnaissance de chaînes d'ubiquitine spécifiques ou interfèrent avec l'efficacité enzymatique. Par exemple, il a été observé que deux isoformes de USP2 et une forme tronquée ne possédant que son cœur catalytique clivaient à la fois les chaînes K48 et les chaînes linéaires, mais avec des efficacités très différentes. Le domaine catalytique clive préférentiellement les chaînes linéaires, alors que l'isoforme USP2-2 est plus efficace pour les chaînes K48 (Lin et al., 2001). Il est donc probable que des séquences hors du domaine catalytique contribuent à la sélection et au positionnement des chaînes spécifiques d'ubiquitine. En outre, les DUBs peuvent posséder des UBDs (Ubiquitin Binding Domain), dont certains ont une faible affinité pour l'ubiquitine. De ce fait, nous pouvons imaginer que la longueur des chaînes intervient dans l'affinité d'une DUB pour son substrat. En effet, ce

type de UBDs ne peuvent reconnaître que des protéines associées à de nombreuses ubiquitines, contribuant à l'augmentation de l'avidité de la DUB pour son substrat (Fischer, 2003).

### **La spécificité du substrat**

La reconnaissance des protéines cibles par les DUBs se fait probablement par des séquences hors du domaine catalytique. A titre d'exemple, un des domaines CAP-Gly de la déubiquitinase CYLD régule son interaction avec son substrat NEMO (Saito et al., 2004). Cependant, comme la majorité des interactions enzyme/substrats, les interactions DUB/protéine ubiquitinée sont faibles et transitoires. Cela complique l'identification des cibles des DUBs *in vivo*. Néanmoins, il a été montré chez la levure que la spécificité de Ubp2 pour son substrat était strictement dépendante de la présence de la ligase E3 Rsp5, qui assure la reconnaissance du substrat (Kee et al., 2005). La présence au sein d'un même complexe de la DUB et de la ligase E3 peut ainsi être un moyen de spécifier le substrat et son ubiquitination. Nous pouvons aussi citer ici le cas remarquable de la DUB A20, appartenant à la famille des OTUs. A20 possède à la fois une activité déubiquitinase et une activité ligase E3, qui régulent ensemble négativement la voie NF-κB (Newton et al., 2008; Wertz et al., 2004). En effet, l'activation de la voie du récepteur au TNF (Tumor Necrosis Factor) entraîne la poly-ubiquitination K63 de la protéine RIP1 (Receptor Interacting Protein 1), nécessaire pour le recrutement des protéines en aval TAK1 (TGFβ Activated Kinase 1) et NEMO. A20 hydrolyse les chaînes d'ubiquitine K63 associées à RIP1 et, de plus, agit comme une E3 ligase en ajoutant des chaînes de poly-ubiquitine K48 sur RIP1, qui vont la cibler pour la dégradation protéasomale (Newton et al., 2008; Wertz et al., 2004). Cette double activité assure la fonction de régulateur négatif de A20.

Il est important de noter que, parfois, les ubiquitine ligases E3 sont elles-mêmes des substrats des DUBs. L'auto-ubiquitination des E3 de type RING est un phénomène fréquemment observé. Par exemple, la ligase NRPD1 (Neuregulin Receptor Degradation Protein-1) stimule sa propre dégradation par son activité d'ubiquitine ligase. Il a été montré que USP8 s'associe à NRPD1 pour la déubiquitinier et la stabiliser (Wu et al., 2004).

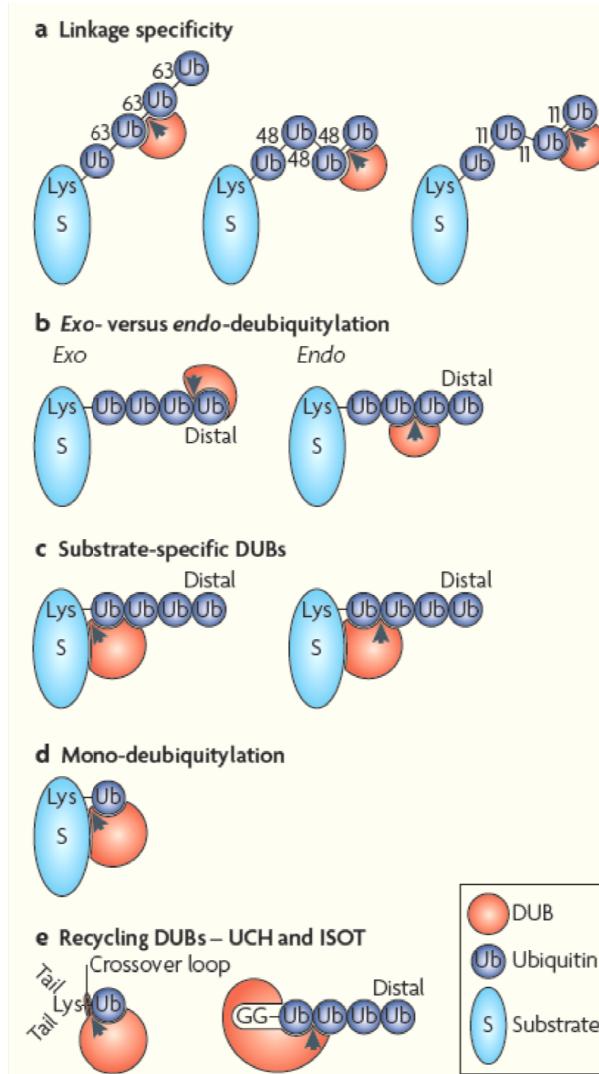
### La régulation des déubiquitinases

La régulation des déubiquitinases est un moyen de contrôler à la fois leur activité et leur spécificité. L'activité *in vitro* des DUBs est souvent faible, ce qui laisse penser que des mécanismes d'activation sont imposés par le contexte cellulaire. De plus, le site de liaison au substrat est parfois inaccessible et la triade catalytique de certaines DUBs est dans une conformation probablement inactive. Cela laisse penser que des changements conformationnels sont nécessaires pour l'activité déubiquitinase. En effet, comme toutes les protéines, les DUBs peuvent être modifiées par des modifications post-traductionnelles. Plusieurs exemples montrent que la phosphorylation peut inhiber l'activité déubiquitinase. Par exemple, lorsqu'elle est phosphorylée, CYLD ne peut plus déubiquitinier son substrat TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) (Reiley et al., 2005). L'activité des DUBs peut aussi être modulée par des molécules d'ubiquitine ou des Ubl. En effet, l'ubiquitination de l'ataxin 3 va la rendre active (Todi et al., 2009). En outre, comme toutes les protéases à cystéine, les DUBs sont sensibles au stress oxydant. Une étude a proposé que le peroxyde d'hydrogène empêche la régulation négative de la voie NF-κB par Cezanne (Cellular Zinc finger Anti-NF-κB), impactant sur sa capacité à déubiquitinier RIP1, et que l'activation de la voie est ainsi favorisée par le stress oxydant (Enesa et al., 2008). D'autres DUBs sont inactivées par clivage protéolytique (Coornaert et al., 2008; Huang et al., 2006). C'est le cas, par exemple, de la déubiquitinase A20 chez l'Homme qui est clivée après son résidu arginine 439 par la paracaspase MALT1 (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue 1), lorsque les récepteurs d'antigènes des cellules T sont stimulés (Coornaert et al., 2008). Ainsi, la déubiquitinase A20 ne peut plus réguler négativement la voie NF-κB.

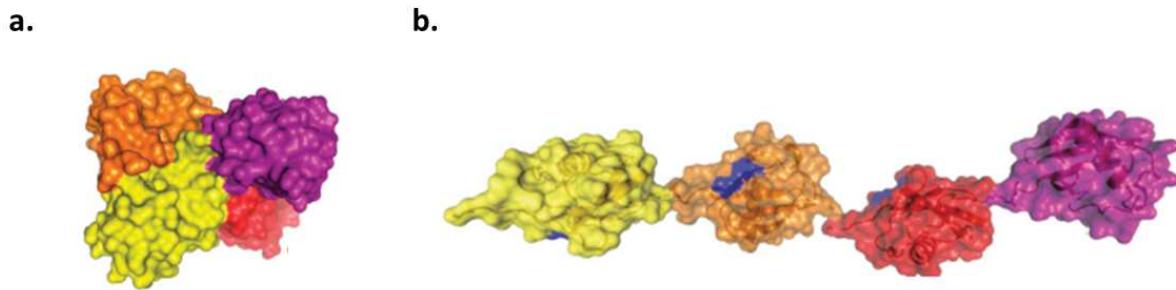
Comme il a déjà été énoncé, les DUBs contiennent des UBDs qui participent à la reconnaissance spécifique d'un type d'ubiquitination. Ces domaines sont également nécessaires pour une hydrolyse efficace de l'ubiquitine. Dans certains cas, ces motifs sont apportés par une protéine extérieure. C'est le cas, par exemple, de la DUB endosomale AMSH qui est activée par l'interaction avec STAM (Signal-Transducing Adaptor Molecule). Cette dernière possède des UBDs qui participent à la capture du substrat ubiquitiné (McCullough et al., 2006). En outre, l'interaction avec des protéines partenaires peut déclencher une activation allostérique des DUBs. C'est le cas de UAF1 (USP1-associated factor 1) qui forme des complexes hétérodimériques avec trois USPs au moins (USP1, USP12 et USP46). Des analyses *in vitro* ont montré que la présence de UAF1 augmentait le

rendement catalytique de ces trois USPs (Cohn et al., 2009). UAF1 possède un domaine, appelé WD40, qui est souvent retrouvé dans les protéines partenaires d'autres USPs (Sowa et al., 2009). Pour être actives, d'autres DUBs ont besoin d'être incorporées dans des gros complexes macromoléculaires, comme la sous-unité 26S du protéasome. De tels complexes servent sûrement d'échafaudage pour la rencontre entre les DUBs et leurs substrats physiologiques ou bien ils peuvent réguler directement l'activité catalytique par des activations allostériques (Komander et al., 2009a). Cependant, d'autres protéines peuvent, au contraire, inhiber l'activité déubiquitinase. Chez la levure, l'enzyme Doa4 est directement inactivée par Rfu1 (Regulator of Free Ubiquitin chains 1) (Wolf and Petroski, 2009).

D'autre part, le couplage de la localisation et de l'activation d'une protéine est un principe fondamental de la biologie cellulaire. La régulation de la localisation cellulaire des DUBs intervient donc dans le contrôle de leur spécificité. En effet, la localisation subcellulaire détermine la palette de substrats à disposition. Par exemple, USP36 se situe dans le nucléole, dont il régule la structure et la fonction (Endo et al., 2009). Cependant, une autre étude effectuée chez *Drosophila melanogaster* montre que cette DUB déubiquitine également la protéine cytoplasmique Imd (Immune Deficiency). Imd est impliquée dans une voie de signalisation de type NF-κB, qui participe à la réponse immunitaire innée et est active dans le cytoplasme (Thevenon et al., 2009). Donc, USP36 a des substrats nucléolaires et cytoplasmiques et, selon sa localisation, il peut agir sur l'un ou l'autre. Des travaux complémentaires de l'équipe montrent que les différentes isoformes de dUSP36 ont des localisations cellulaires distinctes, qui peuvent expliquer cette dualité de fonction (Taillebourg et al., résultats non publiés). En outre, il a été montré que USP8 est transloqué au niveau des endosomes, en réponse à l'EGF (Epidermal Growth Factor), où il déubiquitine l'EGFR (EGF Receptor) pour favoriser sa dégradation lysosomale (Row et al., 2006).



**Figure 6. Différents niveaux de spécificité des déubiquitinases (DUBs).** Le processus d'ubiquitination fait preuve d'une spécificité à différents niveaux et différentes manières d'hydrolyser l'ubiquitine ont été reportées. Les flèches représentent le clivage. (a) Certaines DUBs montrent une discrimination pour un type d'ubiquitination particulier. Cette capacité n'est pas restreint à une famille particulière et chaque famille a des membres qui discriminent une liaison particulière. (b) Le clivage des chaînes d'ubiquitine peuvent se faire à la fin (exo) ou au milieu (endo) d'une chaîne de poly-ubiquitine. Les DUBs «endo» doivent loger des molécules d'ubiquitine de chaque côté du site de clivage, alors que les DUBs «exo» ne lient seulement qu'une molécule d'ubiquitine. (c) Les DUBs peuvent aussi reconnaître directement leur substrat, ce qui conduit à une amputation en un seul coup. Elles peuvent complètement déubiquitinier leur substrat ou bien laisser une mono-ubiquitination (particulièrement dans le cas où la DUB a une spécificité pour un type de chaîne). (d) Les protéines mono-ubiquitinées peuvent sûrement être déubiquitinées par des DUBs qui les reconnaissent spécifiquement. (e) Les membres de la famille des UCHs sont décrits pour enlever des petites séquences désordonnées en C-terminal de l'ubiquitine (e.g. précurseurs d'ubiquitine). USP5 (ou nommée aussi ISOT) recycle l'ubiquitine libre à partir de chaînes de poly-ubiquitine non associées à des protéines. Pour cela, cette USP dispose d'un domaine en doigt de zinc (ZnF-UBP) qui reconnaît le domaine C-terminal libre de l'ubiquitine. (Komander et al., 2009a)



**Figure 7. Différences de conformation entre des chaînes tétra-ubiquitine K48 et K63.** (a) Les chaînes de poly-ubiquitine K48 ont une structure compacte. (b) Au contraire, les chaînes K63 exhibent une structure plus étendue, qui est proche des chaînes linéaires. (Komander et al., 2009b)

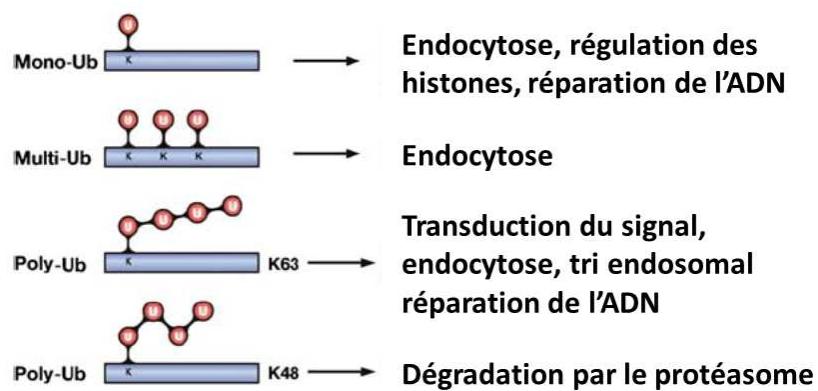
### 3. Le destin des protéines ubiquitinées

L'ubiquitination est un moyen de modifier l'activité ou la stabilité de la protéine cible. Le devenir de la protéine va dépendre du type d'ubiquitination et de la longueur des chaînes qui lui sont associées (Fig. 8). La capacité de liaison des protéines ubiquitinées à des domaines UBDs particuliers est la clé pour former des interactions protéine-protéine spécifiques et pour adresser les protéines dans les différentes voies qui vont influencer leur destin.

Le rôle le plus connu de l'ubiquitination est celui des chaînes de poly-ubiquitine K48 qui permettent l'adressage des protéines cibles vers le protéasome, où elles vont être dégradées. Cette découverte a valu à Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose le Prix Nobel de Chimie en 2004 (Hershko et al., 2000). Ces chaînes K48 doivent être formées par au moins quatre molécules d'ubiquitine, pour diriger les protéines vers la sous-unité 26S du protéasome (Thrower et al., 2000). La dégradation protéasomale permet d'éliminer les protéines endommagées et de réguler le temps de vie d'autres protéines, comme celles impliquées dans des voies de signalisation, ou encore d'assurer un niveau constant de protéines dans la cellule. Une étude a montré que la poly-ubiquitination K11 pouvait également diriger les protéines ciblées vers le protéasome (Jin et al., 2008). La multi-ubiquitination et les chaînes K63 peuvent cibler les protéines vers un autre processus de dégradation : la dégradation lysosomale des récepteurs membranaires. Il semblerait que la multi-ubiquitination soit nécessaire pour l'internalisation des récepteurs par endocytose et que

la poly-ubiquitination K63 intervienne lors de l'adressage les récepteurs internalisés vers les lysosomes (Lauwers et al., 2009). Le rôle de l'ubiquitination dans ce processus est décrit plus en détails dans la partie «Endocytose». De façon singulière, le récepteur Notch non activé est ubiquitiné par des chaînes K29, qui vont entraîner sa dégradation par les lysosomes (Chastagner et al., 2008).

L'ubiquitination des protéines n'est pas seulement un signal de dégradation protéolytique par la voie protéasomale ou lysosomale. En effet, l'ubiquitination d'une protéine entraîne un changement de conformation, qui peut conduire à son activation et/ou lui permettre d'interagir avec des protéines partenaires. Par exemple, les chaînes K63 et linéaires permettent l'activation de protéines impliquées dans des voies de signalisation de type NF-κB (Thevenon et al., 2009; Tokunaga and Iwai, 2012). La mono-ubiquitination peut réguler la fonction des histones et donc, indirectement, le niveau d'expression des gènes (Hicke, 2001). Elle intervient également, tout comme la poly-ubiquitination K63, dans la réparation de l'ADN en ciblant les histones qui sont alors reconnues différemment par des complexes de réparation ou de transcription (Bergink and Jentsch, 2009; Panier and Durocher, 2009). Pour les autres chaînes d'ubiquitine, peu de fonctions sont décrites dans la littérature bien qu'elles aient été détectées par protéomique (Kim et al., 2011). Par exemple, il a été montré que le E3 ligase Ring1B s'auto-ubiquitine par des chaînes K6, K27 et K48 et que ces modifications sont nécessaires pour sa capacité à mono-ubiquitiner l'histone H2A (Ben-Saadon et al., 2006).



**Figure 8. Les fonctions des principales modifications par l'ubiquitine (Ub).** La poly-ubiquitination K48 permet l'adressage de la protéine cible vers le protéasome, où elle va être dégradée. Plusieurs types d'ubiquitination sont impliqués également dans l'endocytose des récepteurs, qui peut conduire *via* le tri endosomal à leur dégradation par les lysosomes. Les chaînes K63 et la mono-ubiquitination jouent un rôle dans la réparation de l'ADN. De plus, la mono-ubiquitination régule l'activité des histones et la poly-ubiquitination K63 contrôle l'activation de protéines impliquées dans des voies de signalisation. (Haglund and Dikic, 2005)

## B. L'endocytose

### 1. L'ubiquitination des récepteurs membranaires dans l'endocytose

Le transport de protéines membranaires vers l'intérieur de la cellule est réalisé par le mécanisme d'endocytose, qui induit l'internalisation d'une fraction de la membrane plasmique. Dans le cas des récepteurs membranaires, le tri endocytaire permet le recyclage des protéines membranaires ou leur envoi dans la voie de dégradation lysosomale. De nombreux articles ont mis en évidence le rôle de l'ubiquitine dans cet adressage. S'il a d'abord été pensé que seule la mono- ou la multi-ubiquitination permettait l'endocytose des récepteurs (Mosesson et al., 2003), il est maintenant admis que les chaînes de poly-ubiquitine de type K63 sont elles aussi un signal pour le tri endosomal (Lauwers et al., 2009). En revanche, il n'est pas exclu que d'autres types d'ubiquitination soient impliquées dans l'adressage aux lysosomes. Par exemple, l'ubiquitination du récepteur Notch par des chaînes K29 entraîne sa dégradation lysosomale (Chastagner et al., 2008). L'ubiquitination intervient à la membrane plasmique pour permettre l'internalisation du récepteur, mais également au niveau des endosomes précoce pour favoriser le tri par les corps multivésiculaires (MVBs ou MVEs) (Piper and Lehner, 2011). La déubiquitination du cargo semble, elle aussi, nécessaire pour poursuivre la voie des lysosomes depuis les endosomes précoce (Komada, 2008). L'ubiquitination de nombreux récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) est catalysée par l'action de la E3 ubiquitine ligase Cbl (Levkowitz et al., 1999; Marmor and Yarden, 2004). Ainsi, l'activité des récepteurs membranaires peut être régulée par le trafic endocytaire. Parfois, l'internalisation du récepteur est nécessaire à la signalisation en utilisant les endosomes comme des plateformes de signalisation (Clague and Urbe, 2001; Lund et al., 2010; McGettrick and O'Neill, 2010) et le plus souvent, elle conduit à son entrée dans la voie des MVBs qui aboutit à la dégradation du récepteur dans les lysosomes (Brou, 2009; Mosesson et al., 2003).

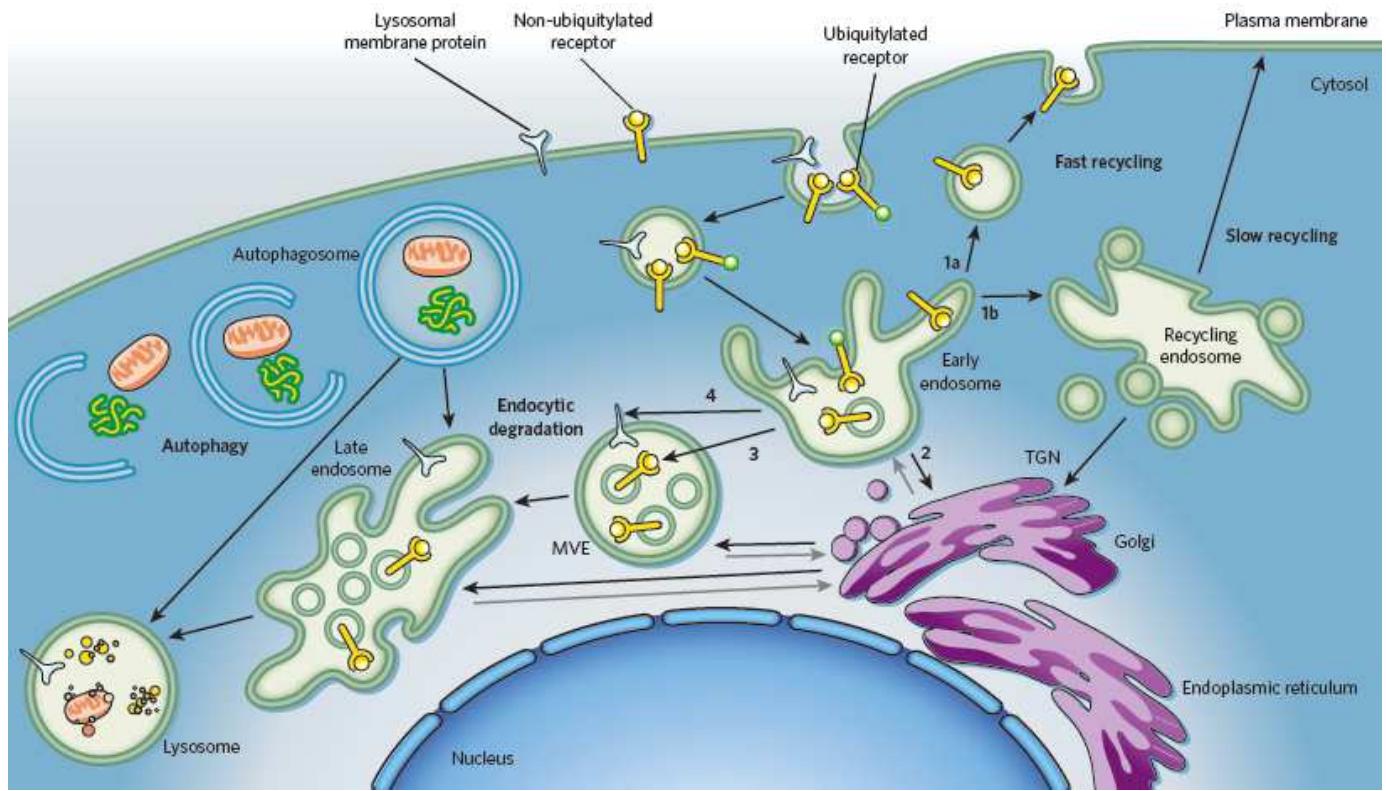
## 2. Le processus d'endocytose

L'endocytose dépendante de la clathrine est la mieux décrite actuellement. Elle module, entre autres, l'endocytose des récepteurs membranaires. Elle débute par la reconnaissance à la membrane cellulaire d'un signal de tri lié au cargo destiné à être internalisé. Ce signal peut varier d'une petite séquence linéaire peptidique (motifs consensus portés par les protéines membranaires du côté cytoplasmique) à des protéines entières réversiblement attachées aux cargos, comme par exemple l'ubiquitine (Bonifacino and Traub, 2003; Traub, 2009). En effet, plusieurs domaines de liaisons à l'ubiquitine ont été identifiés dans les protéines adaptatrices Epsin associées à la clathrine (De Camilli et al., 2002). Au niveau de la membrane plasmique, la séquestration du cargo est couplée mécaniquement à la déformation de la membrane effectuée par des amphiphysines contenant des domaines BAR (Bin1, Amphiphysin, and Rvs161/167p) (Itoh and Takenawa, 2009). Ce domaine permet l'interaction avec les lipides membranaires, la dimérisation des amphiphysines et la déformation de la membrane plasmique (McMahon and Gallop, 2005). Les amphiphysines recrutent la dynamine, qui va permettre à la vacuole en formation de se détacher de la membrane. Ainsi, les récepteurs internalisent depuis la membrane plasmique principalement *via* des vésicules enrobées de clathrine (CCV) (Rao et al., 2012) et sont ensuite dirigés vers les endosomes précoce (Fig. 9). Il existe également une voie indépendante de la clathrine qui permet aux récepteurs membranaires de rejoindre les endosomes précoce en s'associant aux radeaux lipidiques (Di Guglielmo et al., 2003).

Au niveau des endosomes précoce, trois destins sont possibles. Le cargo peut être recyclé à la membrane plasmique, soit directement, soit *via* des endosomes de recyclage. Le recyclage n'est pas seulement important pour réguler l'abondance des récepteurs membranaires à la membrane, mais aussi pour leur distribution spatiale dans des sites spécifiques de la membrane plasmique (Palamidessi et al., 2008). A partir des endosomes précoce, d'autres protéines ou des toxines sont envoyées au réseau Trans-Golgien (TGN), qui va permettre leur relocalisation (Bonifacino and Rojas, 2006). Enfin, les protéines membranaires ubiquitinées vont préférentiellement être incorporées aux vésicules intraluminales (ILVs) et suivre la route des MVBs et des endosomes tardifs pour finir dans les lysosomes, où la membrane des ILVs et le cargo vont être dégradés respectivement par des lipases et des protéases lysosomales (Gruenberg and Stenmark, 2004; Katzmann et al., 2002). Dans les membranes endosomales, le cargo ubiquitiné est reconnu par la machinerie ESCRT

(Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Katzmann et al., 2002) qui va favoriser son tri jusqu'aux corps multivésiculaires (cf. le paragraphe «La machinerie ESCRT»).

L'exemple de l'endocytose du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (EGFR) est le mieux décrit dans la littérature. La voie du récepteur à l'EGF est impliquée dans différents processus cellulaires, comme la mitogénèse, la survie cellulaire, la différenciation et la migration cellulaire. La reconnaissance du ligand EGF entraîne la dimérisation du récepteur, son autophosphorylation et son activation. Il s'ensuit l'interaction de EGFR avec l'ubiquitine ligase Cbl, qui mono-ubiquitine le récepteur sur plusieurs lysines (multi-ubiquitination). L'EGFR est multi-ubiquitiné, bien que sa mono-ubiquitination semble suffire à son internalisation (Mosesson et al., 2003). De plus, une étude de spectrométrie de masse a également montré qu'une fraction significative de EGFR est modifiée par des chaînes de poly-ubiquitine K63 (Huang et al., 2006). L'ubiquitination de l'EGFR entraîne son intégration dans la voie des MVBs et sa dégradation dans les lysosomes, ce qui va réguler négativement la signalisation dépendante de ce récepteur. Un dysfonctionnement dans la régulation de la voie de dégradation de l'EGFR ou un EGFR constitutivement actifs sont associés à certains cancers, comme celui des poumons «non à petites cellules» (Bache et al., 2004; Polo et al., 2004).



**Figure 9. L'internalisation et le tri endocytaire.** Les protéines membranaires sont emmenées à l'intérieur de la cellule et sont ensuite dirigées dans les endosomes précoce, qui reçoivent également des protéines du réseau trans-Golgi (TGN). Selon leur nature, les protéines membranaires vont suivre différents chemins. Certains récepteurs vont être renvoyés à la membrane soit directement (1a), soit via des endosomes de recyclage (1b). D'autres, comme les récepteurs pour les enzymes lysosomales ou des toxines protéiques, vont rejoindre le TGN (2). Les protéines ubiquitinées vont être préférentiellement incorporées aux vésicules intraluminales et passer par les endosomes multivésiculaires (MVEs) et les endosomes tardifs, pour finir éventuellement dans les lysosomes où elles vont être dégradées par des protéases (3). Au contraire, les protéines de membrane lysosomale arrivent à destination en restant dans la membrane des MVEs (4). Les autophagosomes sont aussi capables de fusionner avec les lysosomes pour former les autophagolysosomes, où va être dégradé leur contenu. (Raiborg and Stenmark, 2009)

### 3. La machinerie ESCRT

La machinerie ESCRT a été découverte chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elle est composée de quatre complexes (ESCRT-0, -I, -II et -III) et de protéines associées, conservés au cours de l'évolution. Elle permet le tri de récepteurs dans les vésicules endosomales pour former les MVBs (Gruenberg and Stenmark, 2004). Ces complexes sont composés de protéines Vps (Vacuolar Protein Sorting) et, en l'état actuel des connaissances,

agissent séquentiellement selon leur ordre numérique pour effectuer trois fonctions distinctes. D'abord, ESCRT-0 séquestre les cargos ubiquitinés pour empêcher leur recyclage et les concentre dans des microdomaines de la membrane endosomale. Deuxièmement, ESCRT-I et -II participent à la déformation de la membrane et, finalement, ESCRT-III catalyserait le détachement des invaginations endosomales pour former les vésicules intraluminales contenant le cargo (Raiborg and Stenmark, 2009) (Fig. 10).

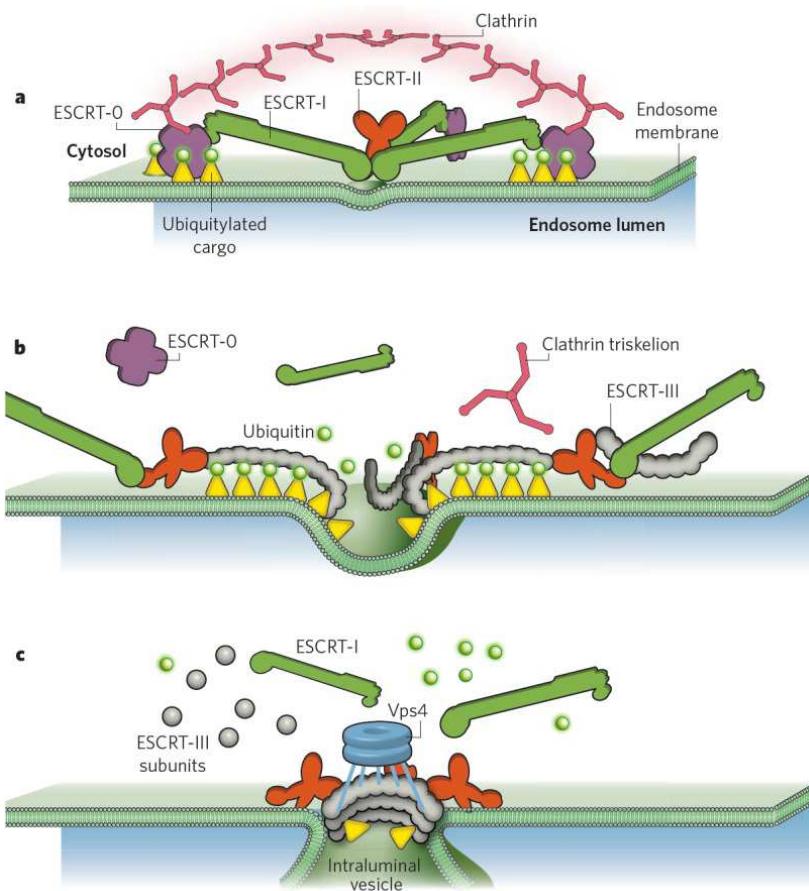
Le complexe ESCRT-0 est le moins conservé au cours de l'évolution et n'a pas été identifié chez les plantes (Leung et al., 2008), mais, tout comme chez la levure, il existe chez les mammifères et la drosophile. ESCRT-0 est un hétérotétramère (2:2) composé de deux sous-unités : Hrs (HGF-Regulated tyrosine kinase Substrate) et STAM (Signal-Transducing Adaptor Molecule) qui sont colocalisées au niveau des endosomes précoce. Chacune des sous-unités possède deux domaines de liaison à l'ubiquitine (UBDs), ce qui leur permet de recruter ensemble les substrats ubiquitinés et d'initier leur tri dans la voie des MVBs (Lloyd et al., 2002; Mayers et al., 2011). Ces UBDs lient l'ubiquitine avec une affinité relativement faible (Fisher et al., 2003; Hirano et al., 2006). Ainsi, la poly-ubiquitination ou la multi-ubiquitination, qui augmentent le nombre de molécules d'ubiquitine sur la protéine ciblée, apparaît comme un moyen de compenser cette faible affinité de ESCRT-0 pour son ligand (Clague et al., 2012b; Lange et al., 2012). En outre, il semble nécessaire que l'interaction du cargo ubiquitiné avec le complexe ESCRT-0 soit faible afin d'assurer l'état transitoire de cette association. Par ailleurs, Hrs possède également des domaines de liaison aux lipides et aux clathrines, qui lui permettent de retenir le cargo dans des microdomaines de la membrane (Raiborg et al., 2001). D'autres protéines que les Vps sont impliquées dans l'endocytose. Par exemple, l'isoforme Eps15b, associée à Hrs, participe à la dégradation de EGFR (Roxrud et al., 2008).

Le complexe ESCRT-I a un domaine d'interaction avec ESCRT-0 et un autre avec ESCRT-II. Contrairement à celles de ESCRT-0, les protéines de ESCRT-I et -II possèdent seulement un UBD. C'est pourquoi, leur rôle intervient probablement une fois que le cargo ubiquitiné ait été concentré par ESCRT-0 (Raiborg and Stenmark, 2009). ESCRT-II possède aussi un domaine de liaison lipidique qui lui permet d'être rattaché à la membrane. Certaines études proposent que ESCRT-0, -I et -II agissent comme un super-complexe, plutôt que séquentiellement (Shields et al., 2009).

Le complexe ESCRT-III est le seul qui ne possède pas de domaine de liaison à l'ubiquitine. Cela indique qu'à cette ultime étape, l'ubiquitination de la protéine cible n'est plus nécessaire à son adressage dans les MVBs, voire qu'une déubiquitination des substrats est requise pour cette étape. En effet, ESCRT-III est associé à de nombreuses DUBs, qui permettraient de déubiquitinier le cargo avant son entrée dans les ILVs. Chez l'Homme, les protéines Vps de ESCRT-III sont également appelées CHMP (Charged Multivesicular Body Protein). D'autres protéines interviendraient dans la scission de la membrane endosomale. C'est le cas, par exemple, de l'ATPase Vps4 qui exerce une force mécanique conduisant au désassemblage de ESCRT-III et à son détachement de la membrane, de façon concomitante à l'individualisation de la vésicule intraluminale (Lata et al., 2009).

Plusieurs études ont montré que certains composants de la machinerie ESCRT étaient régulés par ubiquitination. En effet, les protéines des complexes ESCRT contenant des UBDs sont susceptibles d'être mono-ubiquitinées (Hicke and Riezman, 1996). En particulier, les protéines endocytaires Eps15 (Polo et al., 2002; van Delft et al., 1997), STAM et Hrs (Katz et al., 2002) sont ubiquitinées de façon dépendante de la présence de leur UBD. En outre, les protéines chimériques Eps15-Ub et Hrs-Ub forment des liaisons intramoléculaires dans leur UBD (Hoeller et al., 2006). Le changement conformationnel qui en résulte rend le domaine UBD indisponible pour l'interaction avec le cargo ubiquitiné et, ainsi, inactive les protéines ESCRT.

Dans le cas de Hrs, son domaine UBD permet de recruter la E3 ubiquitine ligase Nedd4, qui catalyse son ubiquitination et, par conséquent, inhibe la fonction endocytaire de Hrs (Katz et al., 2002). Nedd4 est aussi capable d'ubiquitinier la protéine Eps15 (Polo et al., 2002; Woelk et al., 2006), ce qui suggère un rôle plus général de cette ubiquitine ligase dans la régulation des protéines endocytaires possédant des UBDs. Bien que le rôle principal de la mono-ubiquitination des protéines aux domaines UBDs semble être l'inhibition de leur capacité à lier l'ubiquitine, on peut aussi imaginer d'autres changements fonctionnels associés généralement à l'ubiquitination, comme la régulation de l'activité enzymatique, la modification des interactions protéiques ou de la localisation cellulaire (Hicke et al., 2005).

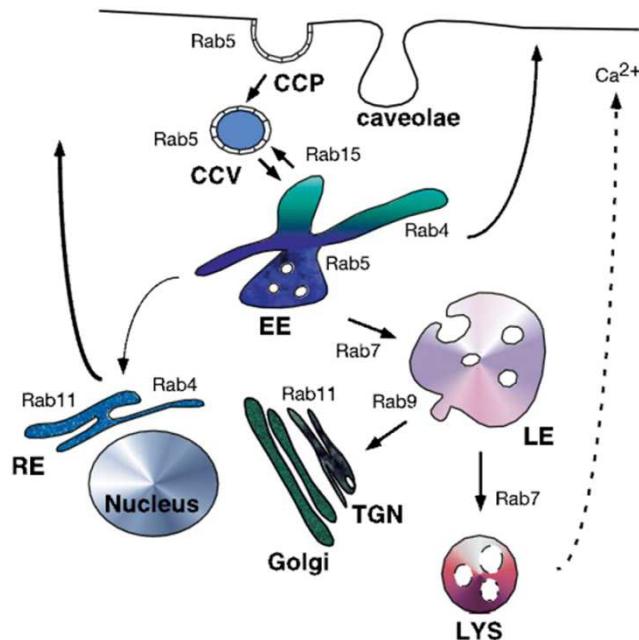


**Figure 10. Le tri endosomal des protéines ubiquitinées par la machinerie ESCRT.** (a) Le cargo ubiquitiné est associé à des microdomaines riches en clathrine, liés par ESCRT-0 grâce à son domaine de liaison à la clathrine. ESCRT-0 initie la reconnaissance du cargo *via* ses domaines de liaison à l'ubiquitine. Ce complexe recrute ESCRT-I, qui lui-même lie ESCRT-II pour permettre la déformation de la membrane endosomale. (b) ESCRT-III est alors mobilisé par ESCRT-II et forme des filaments en forme de spirales. ESCRT-III rassemble le cargo dans l'invagination causée par ses filaments. Pendant cette étape, le cargo est déubiquitiné par des DUBs recrutées par ESCRT-III. (c) Les filaments de ESCRT-III s'organisent en cercles, ce qui contribue à l'invagination de la membrane. Vps4 désassemble ensuite ESCRT-III pour assurer l'assemblage des filaments seulement au niveau de l'isthme de la vésicule. (Raiborg and Stenmark, 2009)

#### 4. Les protéines Rab

Les protéines Rab sont des GTPases impliquées dans le transport vésiculaire des processus d'exocytose et d'endocytose. Elles font parties de la superfamille des petites GTPases Ras. Comme toutes les GTPases, la conformation des protéines Rab diffère selon qu'elle lie le GTP ou GDP. La conformation active des protéines Rab est celle associée au GTP, qui interagit avec des protéines effectrices (Stenmark and Olkkonen, 2001).

Approximativement soixante protéines Rab sont codées par le génome humain et treize d'entre elles ont été identifiées pour leur fonction dans la régulation du trafic endocytaire (Fig. 11). Les protéines Rab5 et Rab15 sont les protéines Rab qui interviennent précocement dans la voie endocytaire. Alors que Rab5 facilite l'internalisation du cargo *via* les CCV et la translocation dans les endosomes précoce (Zerial and McBride, 2001), Rab15 inhibe le transport des protéines membranaires vers les endosomes précoce (Zuk and Elferink, 2000). Au niveau des endosomes précoce, les protéines destinées au recyclage peuvent être renvoyées à la membrane plasmique soit directement à partir de microdomaines contenant Rab4, soit *via* des endosomes de recyclage régulés par Rab11 (Jones et al., 2006). Dans la voie de dégradation lysosomale, Rab7 permettrait le transport du cargo des endosomes précoce vers les endosomes tardifs puis vers les lysosomes (Hyttinen et al., 2013). Ainsi, les protéines Rab gouvernent le trafic vésiculaire à l'intérieur de la cellule et agissent comme des plateformes localisées exerçant un contrôle temporel et spatial sur le transport.



**Figure 11. Le rôle des protéines Rab dans la régulation de l'endocytose.** Les protéines membranaires sont internalisées *via* des vésicules enrobées de clathrine (CCV). Elles sont ainsi transportées vers les endosomes précoce (EE), caractérisés par la présence de Rab5 et Rab4. Rab4 favorise le recyclage rapide des protéines à la membrane, alors que Rab5 conduit à la voie des lysosomes (LYS). Le recyclage à la membrane plasmique peut s'effectuer aussi *via* des endosomes de recyclage (RE), caractérisés par Rab11. Rab7 facilite le transport des endosomes précoce vers les endosomes tardifs (LE) et l'envoi vers le réseau trans-golgien (TGN) est modéré par Rab9. Autre abréviation : Clathrin Coated Pits (CCP). (Stein et al., 2003)

## 5. Les DUBs impliquées dans l'endocytose

L'ubiquitination des récepteurs membranaires est un mécanisme clé dans la régulation de leur internalisation. Rapidement, des études ont permis d'identifier les ubiquitine ligases impliquées dans l'endocytose de récepteurs, comme Cbl et Itch/AIP4 (Chastagner et al., 2008; d'Azzo et al., 2005). En revanche, l'intérêt pour le rôle des déubiquitinases (DUBs) dans la régulation de l'endocytose est beaucoup plus récent. Plusieurs papiers ont mis en évidence deux DUBs fortement impliquées dans la régulation de l'endocytose : AMSH (Associated Molecule with the SH3 domain of STAM) et UBPY (Ubiquitin specific Protease Y, ou aussi appelée USP8) (Clague and Urbe, 2006). Ces deux enzymes ont des rôles différents mais interagissent toutes les deux avec le domaine SH3 (Src Homology 3 domain) de la protéine endocytaire STAM (Kato et al., 2000; Tanaka et al., 1999). En outre, d'autres DUBs agissent comme des régulateurs de l'endocytose mais semblent, à ce jour, spécifiques de certains récepteurs. Ce sont les cas, par exemple, de USP2a et de USP12 qui seront évoqués dans le paragraphe «Autres DUBs impliquées dans l'endocytose des récepteurs» (Liu et al., 2012; Moretti et al., 2012). Enfin, il est important de noter que les récepteur ubiquitinés ne sont pas les seules cibles possibles de DUBs agissant dans l'endocytose, puisque de nombreux composants de la voie endocytaire sont également ubiquitinés et donc susceptibles d'être régulés par des DUBs.

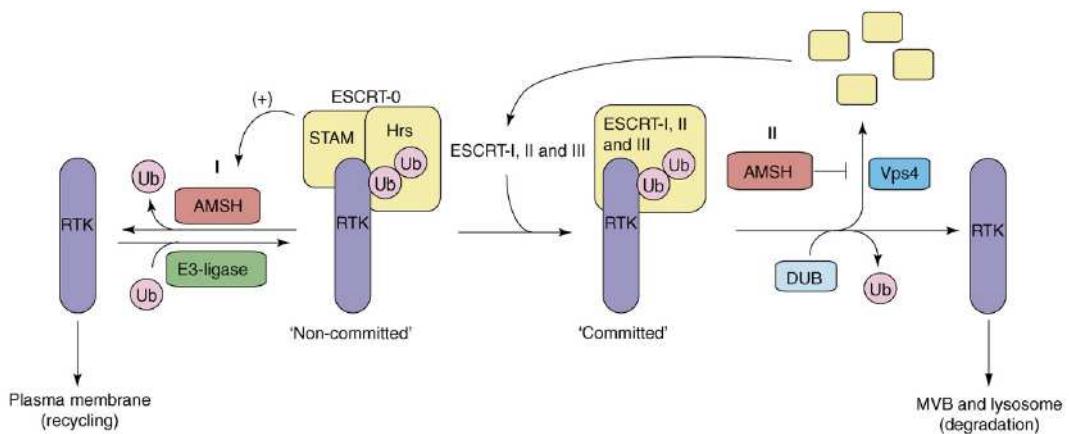
### a. AMSH

AMSH est une DUB appartenant à la famille des métalloprotéases JAMM. Des études *in vitro* ont montré que AMSH hydrolyse préférentiellement les chaînes de poly-ubiquitine K63 plutôt que les chaînes K48 (McCullough et al., 2006). Cette enzyme lie à la fois ESCRT-0, *via* le domaine SH3 de STAM, et différentes sous-unités du complexe ESCRT-III (CHMP1, CHMP2 et CHMP3) (Agromayor and Martin-Serrano, 2006; Komada, 2008). La présence de STAM permet d'augmenter l'activité enzymatique de AMSH *in vitro* (McCullough et al., 2006). En revanche, la localisation de AMSH au niveau des endosomes précoces ne dépend pas de son interaction avec STAM, mais de son domaine de liaison à la clathrine (Nakamura et al., 2006). Le rôle de AMSH dans la régulation de l'endocytose est encore controversé. L'interaction de AMSH avec ESCRT-0 pourrait lui permettre de déubiquitinier précocement les récepteurs membranaires destinés au tri dans les MVBs et ainsi, favoriser leur recyclage à la membrane plasmique (Fig. 12a). Par exemple, AMSH peut

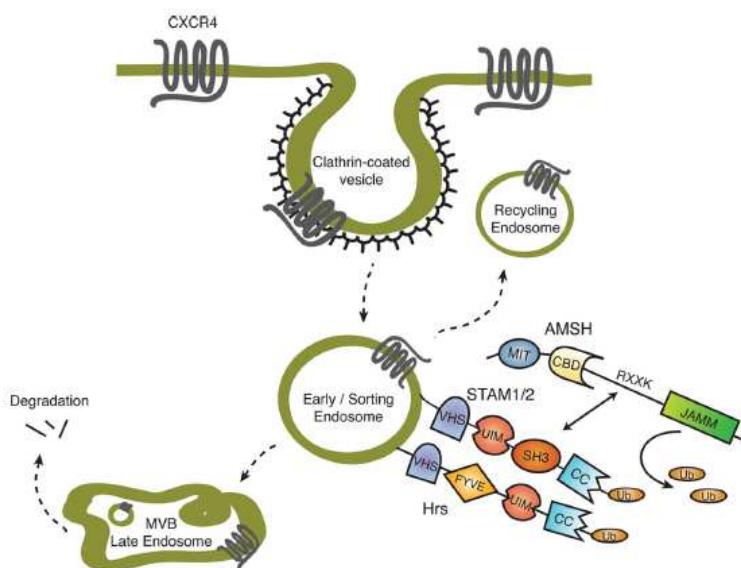
déubiquitinier EGFR *in cellulo*, après stimulation par l'EGF (McCullough et al., 2004). De plus, l'extinction de *AMSH* augmente la dégradation du récepteur EGFR stimulé (McCullough et al., 2004; McCullough et al., 2006). Cependant, une étude plus récente montre que la dégradation de EGFR est, au contraire, inhibée par l'extinction de *AMSH* (Ma et al., 2007). En outre, dans le cas de l'internalisation du récepteur à chemokine CXCR4, *AMSH* déubiquitine les deux composants de ESCRT-0, Hrs et STAM, pour les activer et favoriser la dégradation du récepteur (Sierra et al., 2010) (Fig. 12b).

Finalement, *AMSH* intervient au niveau du complexe ESCRT-III et son activité permettrait d'empêcher la dégradation du récepteur engagé dans le tri endosomal (Fig. 12a). Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'un mutant catalytique de *AMSH* inhibe de façon dominante, aussi bien la dégradation de EGFR que le bourgeonnement du virus HIV, qui nécessite également la machinerie MVB. L'inhibition du bourgeonnement viral n'est pas modifiée par la déletion du domaine de *AMSH* nécessaire pour l'interaction avec STAM, mais dépend plutôt du domaine de liaison à CHMP. En conséquence, ce résultat reflète la compétition entre la protéine Vps4, nécessaire à la scission des vésicules intraluminales, et *AMSH* pour l'interaction au complexe ESCRT-III (Agromayor and Martin-Serrano, 2006). De cette façon, *AMSH* retarderait la dégradation du cargo en bloquant temporairement la formation des MVBs.

a.



b.



**Figure 12. Modèles du rôle de AMSH dans la régulation de la dégradation lysosomale des récepteurs. (a) AMSH est un régulateur négatif de la dégradation des récepteurs à tyrosine kinase (RTKs).** AMSH semblerait agir à deux niveaux, d'après son interaction avec les complexes ESCRT-0 et ESCRT-III, pour réguler négativement l'intégration du récepteur dans la voie des MVBs. I. D'abord, cette enzyme pourrait favoriser le recyclage du récepteur en le déubiquitinant avant son engagement complet dans les MVBs. Cela serait permis par le recrutement de AMSH par STAM, ce qui favoriserait de plus l'activité DUB de AMSH. Dans ce rôle, AMSH s'oppose à l'activité des E3 ligases qui ubiquitinrent le récepteur, entraînant son tri endosomal (e.g. Cbl). II. AMSH peut aussi interférer dans le tri des récepteurs en se disputant la liaison à ESCRT-III avec Vps4, une fois que le récepteur ait été engagé dans les vésicules. Cela pourrait empêcher la scission des vésicules par Vps4. L'entrée du cargo dans la lumière des MVBs nécessite qu'il soit déubiquitiné par une DUB restant à identifier. (Clague and Urbe, 2006) **(b) AMSH favorise la dégradation basale du récepteur CXCR4 en déubiquitinant les composants de ESCRT-0.** L'endocytose constitutive de CXCR4 résulte en son intégration dans les endosomes précoce. Le complexe ESCRT-0, composé de Hrs et STAM, permet le tri du cargo ubiquitiné destiné à la dégradation. AMSH, recrutée par le domaine SH3 de STAM, va déubiquitinier les composants de ESCRT-0 et ainsi les activer. AMSH va, de ce fait, participer à la dégradation lysosomale de CXCR4. Autres abréviations : Ubiquitin Interacting Motif (UIM) ; Coiled-Coil (CC) ; MultiVesicular Body (MVB). (Sierra et al., 2010)

**b. USP8/UBPY**

La déubiquitinase USP8, ou UBPY, est une cystéine protéase de la famille des USPs. Contrairement à AMSH, USP8 est capable d'hydrolyser aussi bien les chaînes de polyubiquitine K48 que les chaînes K63 *in vitro* (Row et al., 2006). Comme AMSH, USP8 est capable de déubiquitinier EGFR et son activité enzymatique sur ce récepteur est même plus forte que celle de AMSH *in cellulo* (Mizuno et al., 2005). Le rôle de USP8 dans la régulation du trafic endocytaire a été décrit dans plusieurs études mais son niveau d'action est lui aussi controversé.

D'abord, plusieurs références décrivent USP8 comme un régulateur négatif du trafic des récepteurs dans les MVBS. En effet, USP8 empêcherait (ou ralentirait) le tri par les complexes ESCRT entraînant une protection des protéines ciblées. Cette activité dépendrait de la formation du complexe STAM-USP8 (Berlin et al., 2010b; Mizuno et al., 2005) (Fig. 13a). Un autre exemple du rôle de USP8 comme régulateur négatif est celui de Smoothened (Smo) chez *Drosophila melanogaster*. Smo est une protéine transmembranaire qui s'associe au récepteur membranaire Patched (Ptc) et permet la transduction du signal lorsque le récepteur Ptc reconnaît son ligand Hedgehog (Hh), afin de réguler la croissance cellulaire et l'homéostasie des tissus adultes (Chen and Struhl, 1996). Smo s'accumule à la membrane cellulaire en réponse à Hh, alors qu'en absence de stimulation, il est en permanence internalisé et dégradé (Denef et al., 2000). Récemment, il a été montré que l'internalisation de Smo dépend de son ubiquitination et que la stimulation par Hh favorise la phosphorylation de Smo au détriment de son ubiquitination. En outre, cette étude montre que USP8 déubiquitine Smo, favorisant, ainsi, son accumulation à la surface cellulaire. Cette accumulation peut résulter d'une atténuation de son endocytose et/ou d'une augmentation du recyclage vers la membrane cellulaire depuis les endosomes précoces, au détriment de l'entrée dans la voie de dégradation lysosomale (Li et al., 2012). Cette hypothèse implique que USP8 se trouve à proximité de la membrane plasmique et au niveau des endosomes précoces. Or, si la localisation cytoplasmique de USP8 n'est pas spécifique d'un organite particulier, il a effectivement été observé que cette déubiquitinase pouvait être relocalisée au niveau des endosomes précoces après une stimulation par l'EGF (Mizuno et al., 2005). Par ailleurs, un mutant catalytique de USP8 est présent constitutivement dans les endosomes, ce qui mène à penser que l'activité déubiquitinase de USP8 est nécessaire pour son détachement de la membrane endosomale (Row et al., 2006).

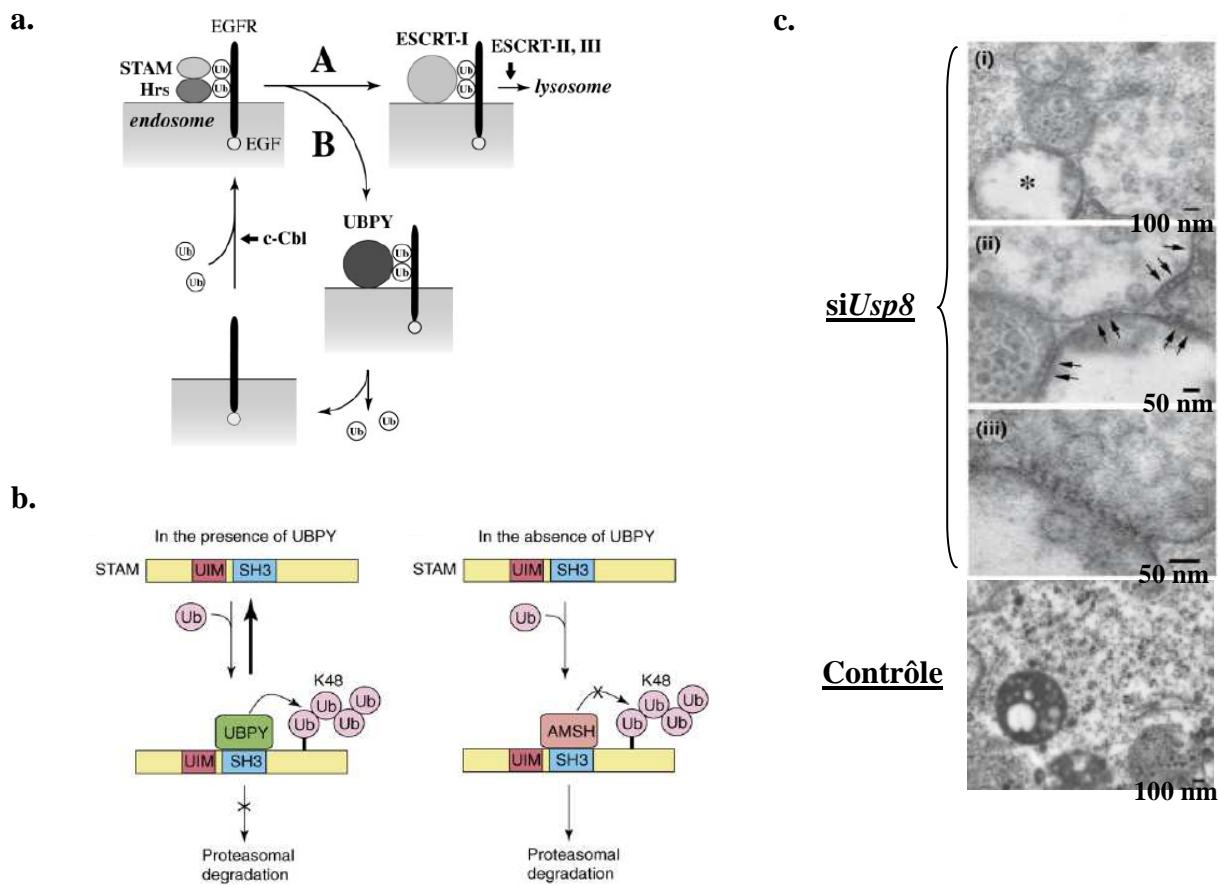
Bien qu'ils aient d'abord décrit USP8 comme un régulateur négatif de la dégradation de EGFR (Mizuno et al., 2005), Mizuno *et al.* ont ensuite montré que le trafic de EGFR vers le compartiment lysosomal était bloqué par l'extinction de *Usp8* (Mizuno et al., 2006). Plusieurs études ont, par la suite, confirmé que USP8 favorise la dégradation de EGFR (Ali et al., 2013; Alwan and van Leeuwen, 2007; Niendorf et al., 2007; Row et al., 2006). Cela pourrait être expliqué par différentes hypothèses. D'abord, l'extinction de *Usp8* entraîne une accumulation de la forme mono-ubiquitinée inactive de la protéine endocytaire Eps15. Il a donc été proposé que USP8 favorise la dégradation des récepteurs en déubiquitinant Eps15 pour libérer ses domaines UBDs et ainsi l'activer (Mizuno et al., 2006). Par ailleurs, l'inhibition de *Usp8* par RNAi ou par mutation conditionnelle a également été associée à une diminution des composants ESCRT-0. Le niveau de Hrs est ainsi réduit de 50%, alors que STAM est complètement dégradée (Niendorf et al., 2007; Row et al., 2006). Or, la perte des protéines ESCRT-0 suffit à la stabilisation de EGFR dans des fibroblastes embryoniques de souris STAM<sup>-/-</sup> (Kanazawa et al., 2003). Comme USP8 est capable d'hydrolyser les chaînes de poly-ubiquitine K48 et que l'ubiquitination de STAM est augmentée en présence d'un inhibiteur du protéasome, Row., *et al.* spéculent que cette enzyme clive des chaînes K48 éventuellement présentes sur STAM pour la sauver de la dégradation protéasomale (Fig. 13b). Cependant, l'ubiquitination par des chaînes K48 de STAM n'a pas été prouvée, mais sont fortement suspectées dans la mesure où sa dégradation est dépendante du protéasome (Row et al., 2006).

Un autre modèle d'action de USP8 sur la voie endocytaire, en revanche, repose sur l'existence d'une interaction entre USP8 et les protéines CHMP du complexe ESCRT-III (Row et al., 2007). Ainsi, il a été montré que USP8 interagit avec la protéine HD-PTP/PTPN23 (His Domain Protein Tyrosin Phospatase/Protein Tyrosine Pospatase type N23) au niveau de ESCRT-III, pour permettre l'intégration de EGFR dans les vésicules intraluminales (ILVs) et sa dégradation (Ali et al., 2013). L'interaction et la déubiquitination du cargo par USP8 favoriserait ainsi l'association du récepteur à ESCRT-III, qui n'a pas de motif UBD, au détriment de l'association avec les complexes ESCRT-0, -I et -II qui en possèdent au moins un.

Il est intéressant de noter qu'il a été observé à plusieurs reprises que l'extinction de *Usp8* provoque une accumulation globale de protéines ubiquitinées et des aberrations morphologiques au niveau des endosomes (Mizuno et al., 2006; Niendorf et al., 2007; Row et al., 2006). La microscopie électronique a permis d'identifier que ces structures anormales sont

des agrégats d'endosomes multivésiculaires car la formation des ILVs n'a pas été bloquée. Ces endosomes sont augmentés en nombre et en taille et semblent être cousus les uns aux autres. Une grande densité d'électrons a, en effet, été observée dans les régions où les membranes endosomales sont jointives (Mizuno et al., 2006; Row et al., 2006) (Fig. 13c). L'agrégation des endosomes est un phénotype couramment observé lorsque le tri endosomal est perturbé. Par exemple, la sur-expression de Hrs cause également ce type de phénotype (Raiborg et al., 2001). Ce défaut morphologique peut donc aussi expliquer pourquoi l'extinction de *Usp8* empêche la dégradation lysosomale du récepteur EGFR : en raison d'un blocage général de la voie lysosomale.

La difficulté de compréhension du rôle de USP8 à l'échelle moléculaire, dans la régulation du trafic endocytaire réside dans le fait que USP8 semble avoir de nombreuses cibles. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le plus proche homologue de USP8 est la déubiquitinase Doa4 (Degradation Of Alpha 4) (Clague and Urbe, 2006). Doa4 se localise au niveau des endosomes *via* son interaction directe avec Snf7, une protéine du complexe ESCRT-III (Bowers et al., 2004). Doa4 déubiquitine les protéines avant leur incorporation dans les vésicules intraluminales et leur cheminement dans la voie lysosomale (Dupre and Hagenauer-Tsapis, 2001; Katzmann et al., 2002). Or, dans les cellules déficientes pour *doa4*, le niveau d'ubiquitine libre dans le cytoplasme est diminué (Swaminathan et al., 1999). Donc, Doa4 déubiquitine les récepteurs destinés à la dégradation lysosomale, ce qui contribue également au maintien de l'homéostasie de l'ubiquitine totale grâce à la libération des ubiquitines liées aux récepteurs. En outre, Doa4 aurait également un rôle dans le tri du cargo endosomal, indépendamment de sa fonction dans le recyclage de l'ubiquitine (Nikko and Andre, 2007). Malgré la conservation du domaine catalytique et du domaine Rhodanèse catalytiquement inactif, le rôle de Doa4 diffère de celui de USP8. En effet, l'inhibition de *Usp8* ne diminue pas le stock d'ubiquitine libre en cellules de mammifères (Row et al., 2006) et le domaine de liaison à la protéine STAM de la protéine USP8 n'est pas présente chez Doa4 (Mizuno et al., 2005). De plus, l'extinction de *Doa4* ne provoque pas d'aberrances dans la morphologie des endosomes chez la levure (Amerik et al., 2000).



**Figure 13. Différents modèles du rôle de USP8 (ou UBPY) dans la régulation de l'endocytose. (a) USP8 ralentit la dégradation du récepteur EGFR.** Au niveau des endosomes, EGFR est recruté par le complexe Hrs-STAM et est transféré à ESCRT-I pour poursuivre la voie de dégradation lysosomale (route A). Une partie de EGFR ubiquitiné est transférée à UBPY. EGFR déubiquitiné va recycler à la membrane endosomale ou rester activé dans les endosomes (route B). Ensuite, c-Cbl peut à nouveau ubiquitinier EGFR, qui est à nouveau recruté par le complexe Hrs-STAM et rejoindre éventuellement la route A pour être dégradé. Ainsi, la route A permet une dégradation rapide de EGFR, alors que la route B ralentit l'intégration du récepteur dans la voie lysosomale. (Mizuno et al., 2005) **(b) USP8 stabilise la protéine endocytaire STAM.** STAM, comme beaucoup de protéines aux domaines de liaison à l'ubiquitine (UIM), est ubiquitinée et les DUBs, comme UBPY, contrent cette modification. L'extinction de UBPY par RNAi provoque la poly-ubiquitination de STAM et sa dégradation par le protéasome. Contrairement à AMSH, UBPY est capable d'hydrolyser les chaînes d'ubiquitine K48 associées à la dégradation protéasomale. Probablement, UBPY stabilise STAM en le déubiquitinant, ce qui le sauve de la dégradation. En ce sens, UBPY est un régulateur positif de la voie de dégradation lysosomale. (Clague and Urbe, 2006) **(c) L'extinction de UBPY provoque une accumulation de MVBs morphologiquement aberrants.** Les cellules HeLa qui expriment moins UBPY accumulent des MVBS élargis qui semblent être cousus les uns aux autres par des filaments régulièrement espacés et denses en électrons (flèches), ce qui n'est pas observé chez les cellules contrôles. (i) Quelques larges MVBS ont seulement un peu de vésicules internes (astérisque), alors qu'en général, le nombre de structures multivésiculaires est augmenté. (ii, iii) Grossissement sur les jonctions des MVBS. Ce défaut dans la morphologie des endosomes soutient plutôt l'hypothèse que USP8 est nécessaire au bon déroulement de la dégradation des récepteurs. (Clague and Urbe, 2006; Row et al., 2006)

c. Autres DUBs impliquées dans la régulation de l'endocytose des récepteurs

Bien que USP8 et AMSH soient très souvent décrites comme les DUBs principales régulant le processus d'endocytose des récepteurs, d'autres déubiquitinases ont été identifiées dans le contrôle de la dégradation de récepteurs spécifiques ou la régulation de protéines endocytaires.

A titre d'exemple, des études de biologie du développement sur l'œil de drosophile ont montré que le gène *fat facets* (*faf*) régule la différenciation des photorécepteurs. L'œil de la drosophile est composé de 800 unités, appelées ommatidies, et chaque unité contient 8 cellules photoréceptrices. Chez le mutant *faf*, chaque ommatidie possède trop de photorécepteurs car la prolifération des cellules est excessive (Fischer-Vize et al., 1992). La protéine Faf, ou aussi connue sous le nom de USP9, est une déubiquitinase de la famille des USPs (Huang et al., 1995). Des expériences génétiques ont ensuite montré que Faf agit dans la même voie que la protéine LqF (Liquid Facet), qui présente de fortes homologies de séquence avec la protéine endocytaire Epsin. En effet, le défaut du mutant *faf* est restauré en sur-exprimant Lqf (Cadavid et al., 2000). Des études structurales suggèrent également que Faf interagit directement avec Lqf (Taya et al., 1999). Donc, Faf empêcherait certaines cellules de se différencier en photorécepteurs, en déubiquitinant la protéine Lqf de la machinerie endocytaire. Cela implique que Faf sauve Lqf de la dégradation ou bien, que l'ubiquitination de Lqf est nécessaire à son activation et que sa déubiquitination est essentielle pour une utilisation répétée dans l'endocytose ou permet la progression à l'étape suivante dans la voie endocytaire (Carthew and Xu, 2000).

Par ailleurs, USP12 est un autre exemple de DUB agissant comme un régulateur positif du trafic endocytaire et de la dégradation lysosomale. Son activité a été spécifiquement décrite sur le récepteur Notch non activé (Moretti et al., 2012). La voie Notch a été très conservée au cours de l'évolution. Elle permet ou inhibe la différenciation, la prolifération ou la mort des cellules, selon le contexte cellulaire. Elle repose sur la communication entre des cellules adjacentes, régulée par la liaison du ligand transmembranaire Delta au récepteur Notch d'une cellule voisine (Greenwald and Kovall, 2013; Nye and Kopan, 1995). Cette reconnaissance déclenche une série de modifications post-traductionnelles et d'événements qui aboutissent au relargage du domaine soluble intracellulaire de Notch, et sa translocation vers le noyau pour permettre l'expression de gènes cibles (Kopan and Ilagan, 2009). Si

l'endocytose est cruciale pour la modification du ligand et le transport de Notch activé jusqu'au noyau, elle l'est aussi pour la dégradation du récepteur non activé (Brou, 2009). En effet, en l'absence du ligand, Notch est constamment internalisé et dégradé par les lysosomes, afin de maintenir une quantité basale de Notch à la membrane. Notch non-induit est polyubiquitiné par des chaînes K29, encore rarement décrites, par la E3 ubiquitine ligase Itch/AIP4 qui favorise sa dégradation lysosomale (Chastagner et al., 2008). Plus récemment, il a été observé que l'extinction de *Usp12* bloque la dégradation du récepteur Notch non activé, qui s'accumule au niveau des corps multivésiculaires, des endosomes tardifs ou des lysosomes (structures identifiées par la présence de la protéines Lamp1). Ce phénotype ne résulte pas d'une activité globale sur la voie endocytaire car la dégradation de l'EGFR n'est pas affectée. De plus, l'extinction de *Usp12* entraîne une accumulation de Notch ubiquitiné, qui est encore augmentée par l'extinction génique de l'activateur UAF1 (USP1-associated factor 1). Au contraire, la surexpression de USP12, mais pas celle de son mutant catalytique, entraîne une perte de l'ubiquitination de Notch. Donc, ces résultats suggèrent que le complexe USP12-UAF1 déubiquitine spécifiquement Notch pour permettre son intégration dans les vésicules des MVBS et, finalement, sa dégradation constitutive par les lysosomes (Moretti et al., 2012).

Le dernier exemple abordé dans ce manuscrit est celui du rôle de l'isoforme USP2a du gène *Usp2*, dans le recyclage du récepteur EGFR. Cette isoforme est surexprimée dans certains cancers, ce qui est associé, entre autres, à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie endocytaire, comme ceux de la voie Rab (Priolo et al., 2006). En outre, cette déubiquitinase est capable d'interagir avec la clathrine, ce qui suggère fortement qu'elle intervient dans l'endocytose (Graner et al., 2004). USP2a est localisée au niveau des endosomes précoces et sa surexpression entraîne une diminution de l'ubiquitination, de l'internalisation et de la dégradation de EGFR, alors que la présence du récepteur à la membrane est augmentée. Ces effets n'apparaissent pas instantanément après l'ajout du ligand EGF, ce qui exclut l'hypothèse d'un effet de USP2a sur la reconnaissance de l'EGF ou sur la formation de la CCV (Clathrin Coated Vesicles). Il est donc fortement probable que USP2a favorise le recyclage de EGFR à la membrane cellulaire. D'ailleurs, en présence de USP2a, la colocalisation de EGFR avec le marqueur des endosomes de recyclage Rab11 est meilleure que celle du contrôle. Donc, USP2a favorise la déubiquitination de EGFR au niveau des endosomes précoces et permet ainsi son recyclage à la membrane plasmique, au détriment de son transfert aux lysosomes (Liu et al., 2012). En revanche, on ne peut pas discriminer si

USP2a agit directement sur EGFR ou sur un composé de la machinerie endocytaire. Finalement, cette étude apporte une hypothèse permettant d'expliquer les propriétés oncogéniques de USP2a car les auteurs observent une corrélation entre l'expression de USP2a et celle de EGFR dans des cellules tumorales humaines. Or, EGFR est un oncogène impliqué dans plusieurs processus de tumorigenèse (Al Olayan et al., 2012; Laurie and Goss, 2013; Masuda et al., 2012). Cependant, USP2a possède d'autres cibles oncogéniques, comme la protéine MDM2, qui peuvent expliquer son pouvoir tumorigène (Stevenson et al., 2007).

## **C.L'immunité**

### **1. Le système immunitaire**

#### **a. La réponse immunitaire**

La survie des organismes multicellulaires repose sur leur capacité à se défendre contre des pathogènes, grâce à leur système immunitaire. La réponse immunitaire est divisée en deux parties : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

La première ligne de défense contre l'invasion de pathogènes est la réponse immunitaire innée (Sato et al., 2009). L'immunité innée est un mécanisme ancien de défense contre les pathogènes car des modes moléculaires conservés ont été trouvés chez les plantes et les animaux (Hoffmann et al., 1999). La réponse immunitaire innée est initiée par la reconnaissance du «non-soi» par l'organisme. Elle possède au moins trois composantes : une réponse cellulaire, une réponse humorale et une réponse épithéliale. Les couches épithéliales recouvrent la peau, le système digestif, les poumons et les voies urogénitales. Les tissus épithéliaux forment une barrière physique séparant les cellules de l'hôte du monde extérieur. Ils apportent ainsi une protection contre des agressions environnementales, mécaniques, chimiques et microbiennes. Les cellules épithéliales subissent des programmes finement régulés de différentiation et de prolifération, qui assurent le renouvellement des tissus épithéliaux sans compromettre leurs propriétés fonctionnelles. Cette tâche est particulièrement difficile car ces tissus sont soumis à de nombreuses attaques provenant de l'extérieur et nécessitent une régulation des programmes de prolifération et de différentiation pour maintenir une homéostasie basale après une blessure. De plus, les cellules épithéliales assurent la régulation de la réponse humorale, permettant ainsi la tolérance des bactéries commensales colonisant les surfaces épithéliales (Pasparakis, 2012).

La réponse humorale comprend les cascades protéolytiques et la sécrétion de molécules pro-inflammatoires et de peptides antimicrobiens. Les cascades protéolytiques jouent un rôle majeur dans les réactions immunitaires car elles peuvent être déclenchées immédiatement, tandis que les réponses impliquant l'expression de gènes spécifiques nécessitent un délai pour la transcription, la traduction et la sécrétion (Cerenius et al., 2010). Chez les vertébrés, l'activation du complément et les cascades de coagulation sanguines sont des exemples de

cascades protéolytiques. En effet, ces systèmes impliquent une succession de clivages protéolytiques par des sérine protéases actives sur la membrane des pathogènes rencontrés, suite à un mécanisme d'opsonisation (Markiewski et al., 2007).

En outre, la reconnaissance du «non-soi» va activer des voies de signalisation qui résultent en la sécrétion de peptides antimicrobiens (AMPs) et de molécules pro-inflammatoires. Les AMPs ont été identifiés pour leur capacité à inactiver les cellules procaryotes en ciblant un grand nombre de leur processus physiques ou métaboliques à la membrane plasmique, à l'extérieur et/ou à l'intérieur des cellules. Ainsi, les AMPs peuvent agir en perturbant l'intégrité de la membrane microbienne en formant des pores (cas des AMPs défensines) ou inhiber, entre autres, les processus de transcription et de traduction (Diamond et al., 2009; Yount and Yeaman, 2013). Les molécules pro-inflammatoires, quant à elles, permettent essentiellement d'informer l'ensemble de l'organisme de l'infection et de réguler la réponse cellulaire. Par exemple, les cytokines, comme les chémokines, les interleukines 1 et 6 (IL-1 et 6) et le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor), sont exprimées en réponse à l'infection. Les chémokines permettent de recruter les lymphocytes (cellules de l'immunité adaptative) et d'autres cytokines, comme IL-6, vont les activer (de la Fuente et al., 2012; Janeway and Medzhitov, 2002).

Par ailleurs, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles contribuent principalement à la réponse cellulaire, en phagocytant et tuant les pathogènes. Un autre aspect de la réponse cellulaire provient du relargage par les cellules immunitaires de cytokines immuno-régulatrices (e.g. les chémokines CCL2), qui permettent, entre autres, le recrutement d'autres cellules sur le lieu de l'infection (phénomène de chimiotactisme) (Goldszmid and Trinchieri, 2012; Schenten and Medzhitov, 2011). La réponse immunitaire innée se met en place rapidement (en quelques minutes), puisque les éléments nécessaires à son activation sont constitutivement exprimés et prêts à être mobilisés à tout moment. Finalement, la sécrétion de cytokines et l'activation des cellules phagocytaires va permettre l'activation de l'immunité adaptative, *via* la stimulation des lymphocytes B et T.

La réponse immunitaire adaptative (ou acquise) n'est, elle, présente que chez les vertébrés et elle s'installe plus lentement (en quelques jours). L'immunité innée et la réponse inflammatoire associée sont strictement requises pour son activation. D'ailleurs, la nécessité d'ajouter un adjuvant pro-inflammatoire dans les vaccins pour stimuler la réponse

immunitaire innée en témoigne (Aguilar and Rodriguez, 2007). L'immunité adaptative fournit une réponse spécifique d'antigènes étrangers *via* la production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes sélectionnés. De plus, elle comprend la mémoire immunitaire. En effet, l'organisme se rappelle de l'antigène rencontré pour réagir plus rapidement, plus intensément et plus spécifiquement lors des prochaines expositions avec ce même antigène grâce à la présence de lymphocytes spécifiques (Flajnik and Kasahara, 2010; Litman et al., 2010).

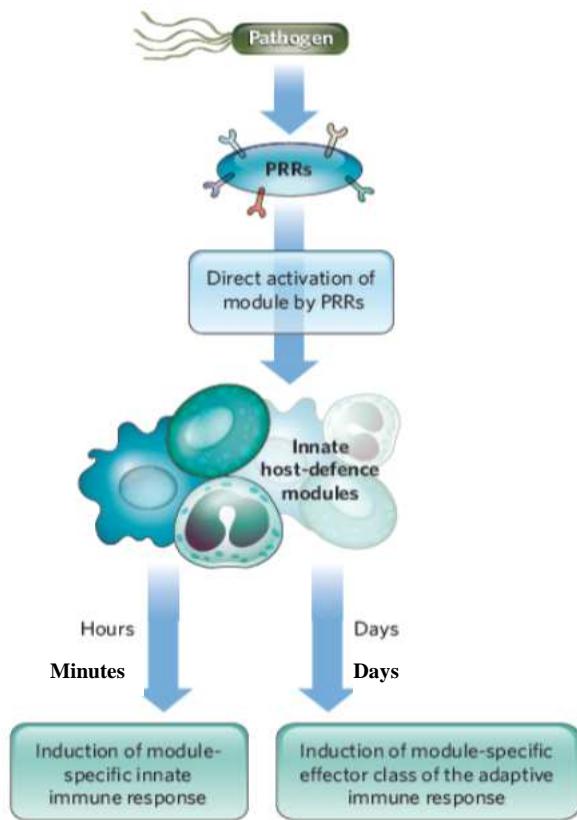
Il est important de noter que l'immunité innée peut aussi conférer une réponse spécifique du pathogène rencontré, voire une mémoire immunitaire (Boehm, 2012). Par exemple, chez la drosophile, l'expression des peptides antimicrobiens diffère selon que l'infection soit réalisée par des champignons, des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif (Lemaitre et al., 1996; Lemaitre et al., 1997). Ainsi, l'attacine et la diptéricine apparaissent plus spécifiques des infections par des bactéries à Gram négatif et la drosomycine est fortement exprimée en réponse à des champignons et des bactéries à Gram positif. Ces différents niveaux d'expression de AMPs en fonction du type d'infection montrent qu'il existe une certaine sélectivité du système immunitaire inné chez les insectes, qui repose sur la sélectivité des récepteurs mis en jeu. En outre, certains invertébrés ont la capacité de mémoire immunitaire, pourtant historiquement associée à l'immunité adaptative (Kurtz, 2005). C'est le cas de *Bombus terrestris* (le bourdon terrestre), qui a une réponse immunitaire meilleure et plus spécifique après l'exposition avec un pathogène déjà rencontré auparavant (Sadd and Schmid-Hempel, 2006). Une étude chez la drosophile montre également une mémoire cellulaire de la réponse à *Streptococcus pneumoniae* (Pham et al., 2007).

#### b. La reconnaissance du «non soi»

La réponse immunitaire innée repose sur l'identification du «non-soi», c'est-à dire la reconnaissance de pathogènes. Cela implique la capacité des cellules hôtes à détecter des motifs moléculaires conservés, qui sont des produits essentiels de la physiologie microbienne et qui sont absents ou cloisonnés à l'intérieur des cellules hôtes (Kumar et al., 2011; Medzhitov and Janeway, 2002). Cette stratégie permet à l'hôte de distinguer le «non-soi» du «soi» et présente l'avantage de cibler des produits indispensables à la survie de l'organisme pathogène. Ces structures conservées sont appelées PAMPs (Pathogen-Associated Molecular

Patterns). Les exemples les plus représentés de PAMPs sont les lipopolysaccharides (LPS) et les peptidoglycans (PGN) des bactéries. Les PAMPs sont produits par tous les microorganismes, qu'ils soient pathogéniques ou non, et sont invariants dans une classe de microorganismes donnée. Cette caractéristique est à l'origine de la reconnaissance d'une énorme diversité de microbes à partir d'un nombre restreint de récepteurs (Janeway and Medzhitov, 2002). De leur côté, les organismes hôtes ont développé un ensemble de récepteurs qui reconnaissent spécifiquement les PAMPs : il s'agit des PRRs (Pattern Recognition Receptors) (Fig. 14).

Les PRRs peuvent être exprimés à la surface cellulaire, dans les compartiments intracellulaires ou bien sécrétés dans le système sanguin ou le liquide tissulaire (Mogensen, 2009). Ainsi, bien que la compartmentalisation fournit des habitats potentiels pour les pathogènes, elle est aussi un fantastique moyen stratégique de défense. Pour atteindre leur niche, les pathogènes doivent souvent traverser plusieurs barrières physiques (membranes cellulaires) et, à chaque étape, se trouvent des PRRs qui vont alerter les cellules hôtes de l'infection (Randow et al., 2013). Certains PRRs sont sécrétés, lient les cellules microbiennes et les marquent ainsi pour leur destruction par le système du complément ou par phagocytose (Medzhitov and Janeway, 2002). D'autres PRRs sont présents à la surface des cellules immunitaires, comme les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles. La détection des PAMPs par les PRRs membranaires déclenchent rapidement des voies de signalisation intracellulaires, qui orchestrent une réponse immunitaire efficace et contrôlée dans le temps (Bourgeois et al., 2010). Ces cascades de signalisation induisent l'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire. Elles activent aussi la réponse inflammatoire, régulée par de nombreuses chemokines et cytokines, et facilitent ainsi l'éradication du pathogène (Kawai and Akira, 2010; Kumar et al., 2009). A l'heure d'aujourd'hui, plusieurs classes de PRRs ont été découvertes et caractérisées chez les mammifères, comme les récepteurs Toll-like (TLRs), RIG-I-like (RLRs), NOD-like (NLRs), les récepteurs au sucre et les récepteurs d'ADN (capteur cytosolique d'ADN). Ces récepteurs constituent la première ligne de reconnaissance des pathogènes intracellulaires ou extracellulaires et peuvent détecter différentes classes de molécules, comme des protéines, des lipides, des carbohydrates et des acides nucléiques (Akira et al., 2006; Kumar et al., 2011).



**Figure 14. Activation des mécanismes de défenses chez l'hôte.** Le système immunitaire inné est activé par la reconnaissance des motifs PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) d'un pathogène par les récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptors). La réponse immunitaire est induite rapidement (de l'ordre de quelques minutes) et, chez les vertébrés, elle active, à son tour, la réponse immunitaire adaptative qui se met en place plus lentement (après plusieurs jours). Le système immunitaire adaptatif apporte la spécificité de la réponse immunitaire (anticorps) et abouti par la mise en mémoire de l'agent pathogène. (Medzhitov, 2007)

### c. La réponse immunitaire chez la drosophile

*Drosophila melanogaster* est un formidable modèle pour étudier le système immunitaire inné. En effet, les gènes et les voies de signalisation de la réponse immunitaire innée ont été bien conservés au cours de l'évolution, de la mouche au mammifère (Kornberg and Krasnow, 2000). La mouche du vinaigre ne possède qu'une composante innée, qui la protège contre un large spectre de microorganismes, comme en témoigne sa capacité à prospérer dans des milieux infectés (fruits pourris). La réponse immunitaire cellulaire chez la drosophile dépend des hémocytes produits par la glande lymphatique. Ces cellules sont proches des cellules sanguines de la lignée des phagocytes ; elles existent sous la forme d'îlots sessiles dans l'organisme ou circulantes dans l'hémolymphé, où elles assurent la phagocytose et l'encapsulation des microbes (Hultmark, 2003; Schlenke et al., 2007). La réponse humorale est principalement activée dans le corps gras de la mouche, l'analogue fonctionnel du foie chez l'Homme (Aggrawal and Silverman, 2007). Elle permet la production rapide de peptides antimicrobiens, dont la transcription est contrôlée par deux voies de signalisation NF- $\kappa$ B

(Nuclear Factor  $\kappa$ B) : les voies Toll et IMD (Immune Deficiency) (Hetru and Hoffmann, 2009). Les voies Toll et IMD sont similaires respectivement aux voies TLR et TNF-R (Tumor Necrosis factor) des mammifères (Hoffmann and Reichhart, 2002). En outre, l'infection s'accompagne souvent d'une mélanisation autour des microbes encapsulés, résultant de l'activation de la cascade prophénoloxidase (Soderhall and Cerenius, 1998). Cette cascade protéolytique intervient dans l'hémolymphé et résulte en la production d'éléments cytotoxiques comme ROS (Reactive Oxygen Species) et de mélanine, qui sont probablement toxiques pour les microorganismes (Cerenius and Soderhall, 2004). Le système immunitaire de *Drosophila* comprend également une coagulation localisée autour des blessures dans la cuticule (Bidla et al., 2005).

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons, plus particulièrement, à la régulation par ubiquitination des voies de signalisation Toll et IMD, ainsi qu'aux récepteurs PGRPs (Peptidoglycan Recognition Proteins) impliqués dans la reconnaissance des pathogènes.

## 2. Les voies de l'immunité

### a. Les voies Toll de la drosophile et TLRs des mammifères

La voie Toll a initialement été identifiée par des cibles génétiques de gènes impliqués dans le développement embryonnaire de *Drosophila*. Ces cibles ont conduit à la découverte de gènes importants pour la formation de l'axe dorso-ventral chez l'embryon, comme *Toll*, *tube*, *pelle*, *cactus*, l'homologue NF- $\kappa$ B *dorsal* et sept gènes en amont de *Toll* (Belvin and Anderson, 1996; Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Comme NF- $\kappa$ B est impliqué dans l'immunité des mammifères et que le papillon de nuit *Hyalophora cecropia* exprime un facteur immunitaire NF- $\kappa$ B-like, il a été progressivement suspecté qu'il existait un parallèle entre les voies de signalisation du développement embryonnaire et l'activation du système immunitaire chez la drosophile (Sun and Faye, 1992; Wasserman, 1993). Ainsi, en 1996, Toll a été identifié pour la première fois comme un activateur de la réponse immunitaire chez *Drosophila* (Lemaitre et al., 1996; Rosetto et al., 1995). Par la suite, des travaux ont permis de repérer les analogues TLR (Toll-Like Receptors) impliqués également dans la réponse

immunitaire des mammifères. Pour leurs travaux sur les récepteurs Toll et TLRs, Jules Hoffmann et Bruce Beutler ont reçu le prix Nobel de physiologie et médecine 2011.

Neuf gènes codant pour des récepteurs Toll ont été identifiés dans le génome de la drosophile et dix TLRs chez l'humain (Medzhitov et al., 1997; Tauszig et al., 2000). A part le récepteur Toll, les autres récepteurs Toll de la drosophile ne semblent pas avoir de rôle majeur dans la réponse immunitaire. Les récepteurs Toll et TLRs ont une structure moléculaire commune, avec un ectodomaine principalement composé de motifs répétés riches en leucine avoisinant des régions riches en cystéine (Tauszig et al., 2000). En outre, les récepteurs Toll de la mouche et IL-1R (Interleukin Receptor-1) de la famille des TLR des mammifères partagent un domaine homologue cytosolique, nommé TIR (Toll/IL-1R). Ces domaines interagissent avec des molécules adaptatrices, pour activer la signalisation en aval de Toll (Imler and Hoffmann, 2001). En revanche, contrairement au récepteur Toll de la drosophile, les récepteurs TLRs des mammifères ne semblent pas être impliqués dans le développement embryonnaire (Kimbrell and Beutler, 2001). Dans le système immunitaire, la voie Toll de la drosophile participe à la réponse cellulaire, puisqu'elle contrôle, avec d'autres voies, la prolifération et la densité des hémocytes (Sorrentino et al., 2004; Zetervall et al., 2004). Mais, la voie Toll joue surtout un rôle majeur dans la réponse immunitaire humorale. En effet, les infections par des champignons ou des bactéries à Gram positif déclenchent indirectement l'activation de la voie Toll, résultant par la production de peptides antimicrobiens. Le peptide antifongique drosomycine est une cible majeure de la réponse Toll (Aggarwal and Silverman, 2008; Hetru and Hoffmann, 2009).

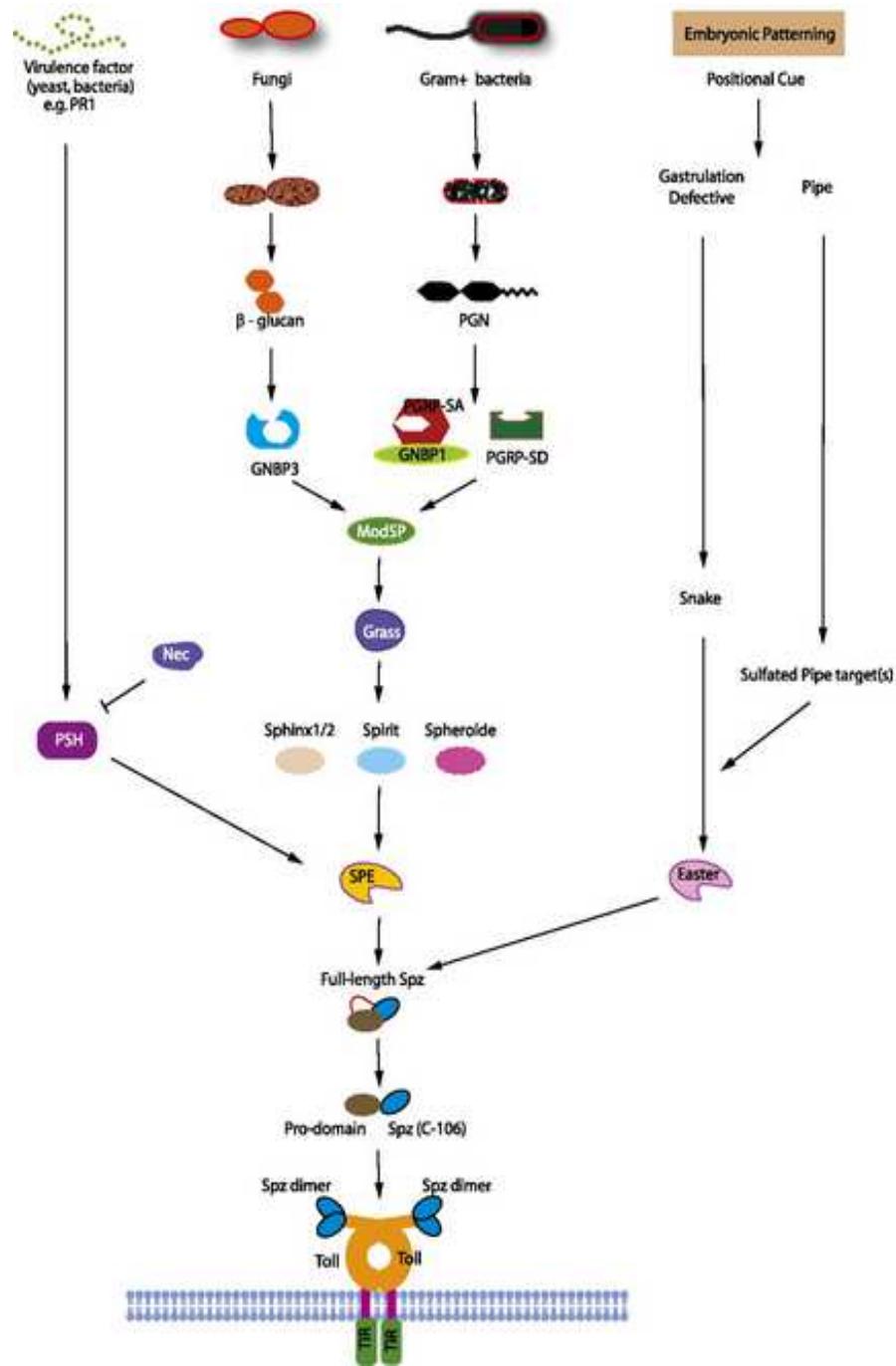
#### Activation du ligand Spätzle chez la drosophile :

Contrairement aux récepteurs TLRs chez les mammifères qui reconnaissent directement différents PAMPs (LPS, PGN, lipoprotéines,...), le récepteur Toll de la mouche n'agit pas comme un PRR, puisqu'il ne reconnaît pas directement des motifs du «non-soi» mais le ligand Spätzle (Spz), dont l'activation résulte d'une cascade protéolytique effectuée par des protéines extracellulaires (Schneider et al., 1994; Weber et al., 2003) (Fig. 15). En effet, Spz est synthétisé et sécrété sous la forme d'un précurseur inactif, composé d'un prodomaine et d'une région C-terminale (DeLotto and DeLotto, 1998). En condition basale, le prodomaine de Spz masque la région C-terminale majoritairement hydrophobe. La reconnaissance du

«non-soi» provoque la protéolyse de Spz par l'enzyme SPE (Spz-Processing Enzyme), ce qui entraîne un changement conformationnel dévoilant les facteurs déterminants de Spz pour la liaison au récepteur Toll (Arnot et al., 2010 ; Jang et al., 2006). Selon le modèle actuel, l'activation de SPE provient de trois cascades en amont selon le type de microorganismes impliqué dans l'infection.

D'abord, deux cascades de protéases, entraînant l'activation de la sérine protéase Grass (Gram-positive-Specific Serine protease), sont initiées par les composants de la paroi cellulaire des champignons ( $\beta$ -glucanes) et des bactéries à Gram positif (peptidoglycane de type Lysine) (El Chamy et al., 2008). La reconnaissance des  $\beta$ -glucanes de champignons est effectuée par les PRRs GNBP3 (Gram-Negative Binding Protein 3) et les peptidoglycanes de type Lysine des bactéries à Gram positif sont reconnus par le complexe GNBP1/PGRP-SA (Peptidoglycan Recognition Receptor Protein SA) et la protéine PGRP-SD (Gobert et al., 2003; Gottar et al., 2006; Michel et al., 2001). En amont de Grass, la protéase ModSP (Modular Serine Protease) joue un rôle essentiel dans l'intégration du signal depuis la reconnaissance des PAMPs par les PRRS jusqu'à la cascade Grass-SPE-Spz (Buchon et al., 2009).

Une troisième cascade conduisant à l'activation de SPE implique la protéase Persephone (PSH), qui devient mature par des clivages protéolytiques effectués par le facteur de virulence PR1 sécrété par les champignons ou par des facteurs de virulence bactériens des Gram positifs (El Chamy et al., 2008; Gottar et al., 2006). Par ailleurs, il est intéressant de noter que, pour la formation de l'axe dorso-ventral, l'activation de Spz résulte d'une cascade protéolytique indépendante de celles que nous venons de décrire (Cho et al., 2010).



**Figure 15. Les cascades protéolytiques impliquées dans l'activation de Spätzle (Spz).** Dans la réponse immunitaire, trois cascades de protéases conduisent à l'activation de SPE (Spätzle Processing Enzyme), qui clive la forme entière de Spz. La cascade Persephone (PSH) détecte les facteurs de virulence et est activée par les bactéries à Gram positif et les champignons vivants. Les deux autres cascades sont activées par les récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptors) qui lient des composants de la paroi cellulaire de champignons et de bactéries à Gram positif. Ces deux cascades convergent au niveau de ModSP (Modular Serine Protease) et Grass (Gram-positive-Specific Serine protease), en amont de l'activation de SPE. Par clivage protéolytique, la partie C-terminale de Spz est exposée et, ensuite, Spz est reconnu par le récepteur Toll, ce qui initie la signalisation intracellulaire. (Valanne et al., 2011)

### La voie Toll de la drosophile

La reconnaissance de Spz activé entraîne probablement la dimérisation du récepteur Toll (Weber et al., 2005) et Toll activé lie, à son tour, la protéine adaptatrice dMyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) par son domaine TIR (Tauszig-Delamasure et al., 2002). Grâce à cette interaction, la protéine adaptatrice Tube et la sérine-thréonine kinase Pelle sont recrutées pour former le complexe hétérotrimérique dMyD88-Tube-Pelle par des interactions *via* des domaines DD (Death Domain) (Moncrieffe et al., 2008). Les protéines dMyD88 et Pelle ne sont pas en contact l'une et l'autre ; au contraire, deux domaines DD distincts de la protéine Tube lie séparément dMyD88 et Pelle (Sun et al., 2002). Ensuite, le complexe oligomérique dMyD88-Tube-Pelle induit la signalisation qui permet la phosphorylation et la dégradation du facteur I-κB (Inhibitory κB) Cactus. La dégradation de Cactus dépend de sa phosphorylation. L'activité kinase de Pelle est nécessaire à la phosphorylation de Cactus mais il n'a pas pu être démontré que Pelle phosphoryle directement Cactus (Huang et al., 2010; Towb et al., 2001). En condition basale, Cactus lie les facteurs de transcription NF-κB (Nuclear Factor κB) Dorsal ou Dif (Dorsal-related Immune Factor), en empêchant leur activation et leur localisation nucléaire. En conséquence, la translocation nucléaire de Dorsal/Dif nécessite la dégradation de Cactus (Wu and Anderson, 1998) et permet la transcription d'un grand nombre de gènes gouvernant la réponse immunitaire, comme celui de la *drosomycine* (Hetru and Hoffmann, 2009) (Fig. 16a).

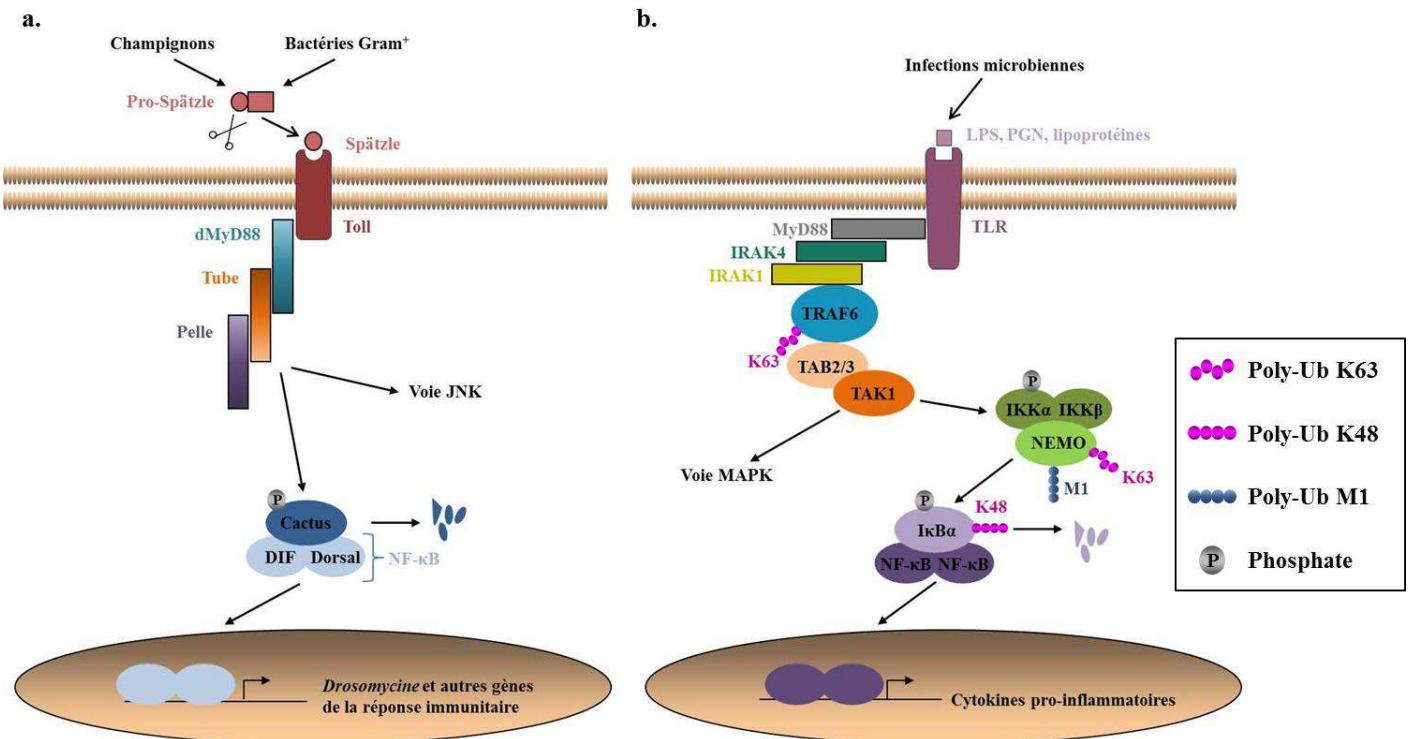
Dorsal est un facteur de transcription de la famille Rel, initialement décrit comme un morphogène important dans la polarisation dorso-ventrale *via* le contrôle de l'expression de gènes essentiels dans la différentiation ventrale. Dorsal interagit avec Pelle, Tube et Cactus et, en réponse à l'infection, il est transloqué dans le noyau et permet l'expression des gènes codant pour des AMPs (Edwards et al., 1997; Yang and Steward, 1997). En effet, Dorsal peut activer le promoteur de la *diptéricine in vitro* (Gross et al., 1996). D'autre part, Dif ne participe pas à la formation de l'axe dorso-ventral. En revanche, il régule la réponse immunitaire, notamment dans la larve de drosophile, et interagit avec Cactus *in vitro* (Tatei and Levine, 1995; Valanne et al., 2011). Dif, mais pas Dorsal, permet l'induction du gène codant pour le peptide antifongique drosomycine chez les mouches adultes, alors que Dorsal et Dif semblent être redondants chez les larves (Lemaitre et al., 1996; Manfruelli et al., 1999; Rutschmann et al., 2000). En outre, Dif et Dorsal peuvent former des hétérodimères *in vitro* (Gross et al., 1996).

Le rôle de la voie Toll dans l'immunité ne se limite pas à l'expression de peptides antimicrobiens. En effet, des analyses transcriptomiques ont identifiées au moins 400 gènes exprimés en réponse à une infection bactérienne ou fongique (De Gregorio et al., 2001; De Gregorio et al., 2002; Irving et al., 2001). En outre, une étude suggère que la voie Toll peut activer la voie JNK (Jun N-terminal Kinase), pour réguler l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux blessures septiques (Boutros et al., 2002).

### La voie TLR chez les mammifères

Chez les mammifères, tous les TLRs, sauf TLR3, peuvent induire une signalisation dépendante de MyD88 pour permettre l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Brown et al., 2011). En effet, l'activation des récepteurs TLRs par la reconnaissance de motifs microbiens (comme les LPS, PGN, lipoprotéines...) entraîne l'association de TLR par son domaine intracytoplasmique TIR avec la protéine adaptatrice MyD88. Une étude récente a prouvé que Tube est un homologue de IRAK4, au même titre que Pelle est celui de IRAK1 (Towb et al., 2009). MyD88 interagit avec IRAK4 *via* son domaine DD et, à son tour, IRAK4 active d'autres protéines de la famille IRAK, dont IRAK1 (Brown et al., 2011; Li et al., 2002). Ce procédé conduit au recrutement et à l'activation de l'ubiquitine ligase TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factor 6) (Brown et al., 2011; Valanne et al., 2011). L'oligomérisation de TRAF6 entraîne son auto-ubiquitination (Wang et al., 2001). Chez la drosophile, des homologues de TRAF ont été identifiés mais ils ne semblent pas participer à la signalisation immunitaire (Kleino et al., 2005; Sun et al., 2002). Chez les mammifères, TRAF6 transmet le signal à la kinase TAK1 (TGF $\beta$  Activated Kinase 1) et au complexe de protéines TABs (TAK1 Binding proteins) (Chen, 2005). Les protéines adaptatrices TAB2 et TAB3 contiennent chacune un UBD (Ubiquitin Binding Domain), qui reconnaît spécifiquement les chaînes K63 (Kanayama et al., 2004). TAK1 est le point de bifurcation entre un signal qui conduit à la phosphorylation du complexe IKK (voie NF- $\kappa$ B) et un autre *via* la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Wang et al., 2001). Dans la voie NF- $\kappa$ B, le complexe de kinase IKK est composé de trois sous-unité : IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et IKK $\gamma$  (ou NEMO, pour NF- $\kappa$ B Essential Modulator) (Silverman et al., 2000). La sous-unité NEMO est d'ailleurs connue pour être modifiée par des chaînes de poly-ubiquitine K63 et linéaires nécessaires à la signalisation NF- $\kappa$ B (Tang et al., 2003; Tokunaga and Iwai, 2012; Zhou et al., 2004). Le complexe IKK phosphoryle la sous-unité inhibitrice I $\kappa$ B $\alpha$ , ce qui conduit à sa poly-

ubiquitination K48 et à sa dégradation protéasomale (Chen et al., 1995; Chen, 2005; Ghosh et al., 1998). Ainsi, le facteur de transcription va transloquer dans le noyau pour activer la transcription de cytokines pro-inflammatoire (Fig. 16b). Contrairement aux mammifères, le complexe IKK de drosophile n'est pas impliqué dans la phosphorylation et la dégradation de la protéine I $\kappa$ B Cactus (Valanne et al., 2011). Par ailleurs, il est important de noter que les TLRs peuvent aussi activer une voie de signalisation indépendante de MyD88 pour permettre la production d'interférons de type I (cf. paragraphe «Endocytose du récepteur TLR4 des mammifères») (Brown et al., 2011).



**Figure 16. Comparaison entre la voie Toll de la drosophile et la voie des TLR dépendante de MyD88.** (a) Chez la drosophile, l'infection par des champignons ou des bactéries à Gram positif entraîne le clivage protéolytique de Pro-Spätzle, pour former le ligand actif Spätzle. La reconnaissance de Spätzle par le récepteur transmembranaire Toll va permettre de recruter dMyD88, Tube et Pelle. Dans son rôle immunitaire, la voie Toll induit les voies JNK et NF-κB. Dans la signalisation NF-κB, la phosphorylation de la sous-unité inhibitrice IκB Cactus est importante pour sa dégradation. Il s'ensuit alors la translocation des facteurs de transcription de type NF-κB Dorsal et DIF dans le noyau, où ils vont permettre la transcription de gènes essentiels à la réponse immunitaire, comme celui codant pour le peptide antifongique drosomycine. (b) Chez les mammifères, les récepteurs TLRs sont activés par des motifs microbiens, comme les LPS, les PGN ou des lipoprotéines. Ensuite, TLR recrute MyD88 qui lie IRAK4. IRAK4 recrute des protéines IRAK, comme IRAK1. L'ubiquitine ligase TRAF6 est ensuite recrutée et s'auto-ubiquitine par des chaînes K63 (Poly-Ub K63), ce qui va mobiliser la kinase TAK1 et ses protéines adaptatrices TAB2 et TAB3. A ce niveau, TAK1 peut induire les voies MAPK ou NF-κB. Dans la voie NF-κB, TAK1 phosphoryle le complexe de kinase IKK, dont la sous-unité IKK $\gamma$  (ou NEMO) est poly-ubiquitinée par des chaînes K63 et linéaires (Poly-Ub M1). Le complexe IKK phosphoryle à son tour la sous-unité inhibitrice IκB $\alpha$ , ce qui entraîne son ubiquitination K48 (Poly-Ub K48) et, en conséquence, sa dégradation protéasomale. Pour finir, les facteurs de transcription NF-κB transloquent dans le noyau pour exprimer des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires.

**b. Les voies IMD de la drosophile et TNF-R des mammifères**

La découverte de la voie IMD a débuté avec l'identification d'une mutation entraînant un défaut dans la réponse immunitaire. Ce nouveau mutant a été nommé *imd* (*Immune Deficiency*) (Corbo and Levine, 1996; Lemaitre et al., 1995). Comme le mutant *imd* était toujours capable de produire le peptide antifongique drosomycine, l'existence de deux voies de signalisation distinctes en réponse aux infections bactériennes ou fongiques a été suggérée (Lemaitre et al., 1995). Bien que des préparations de lipopolysaccharides (LPS) étaient utilisées pour induire la voie IMD de la drosophile, il a été montré que cette voie était plutôt activée par des peptidoglycans (PGN) de bactéries à Gram négatif contaminant les préparations de LPS (Leulier et al., 2003; Silverman et al., 2000; Werner et al., 2003). Les PGN des bactéries à Gram négatif différents de ceux à Gram positif parce qu'ils contiennent l'acide aminé DAP (acide *méso*-Diaminopimélique) en troisième position, alors que ceux des bactéries à Gram positif, à l'exception de *Bacillus subtilis* qui active la voie IMD, ont généralement une lysine à cette position (Kaneko and Silverman, 2005). Cette différence permet d'expliquer l'activation préférentielle de la voie IMD par les bactéries à Gram négatif (Lemaitre et al., 1997; Leulier et al., 2003). Par ailleurs, les mouches portant des mutations dans le gène *ird7* (*Immune Response Deficient 7*), qui sera par la suite décrit sous la nomenclature *PGRP-LC*, ont une expression réduite de peptides antimicrobiens en réponse à la stimulation par des bactéries à Gram négatif (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Wu et al., 2001).

*PGRP-LC* est un récepteur transmembranaire et le gène *PGRP-LC* code pour trois isoformes principales résultant de l'épissage alternatif (Choe et al., 2002; Werner et al., 2003; Wu et al., 2001). Ces isoformes formeraient des hétérodimères et les différentes combinaisons entre les isoformes permettent de créer des récepteur spécifiques (Choe et al., 2005). Ce point sera détaillé dans le paragraphe «Le récepteur immunitaire *PGRP-LC*». Contrairement au récepteur Toll, *PGRP-LC* est un récepteur PRR, puisqu'il semble reconnaître directement les PGN de type DAP, même si cette interaction n'a pas encore été mise en évidence (Kaneko and Silverman, 2005). Bien qu'il ne possède pas de motifs de signalisation connus, le domaine cytoplasmique du récepteur *PGRP-LC* initie très probablement la cascade de transduction du signal (Kaneko and Silverman, 2005). De plus, il a été montré que *PGRP-LC* recrute la protéine adaptatrice *Imd* (Choe et al., 2005).

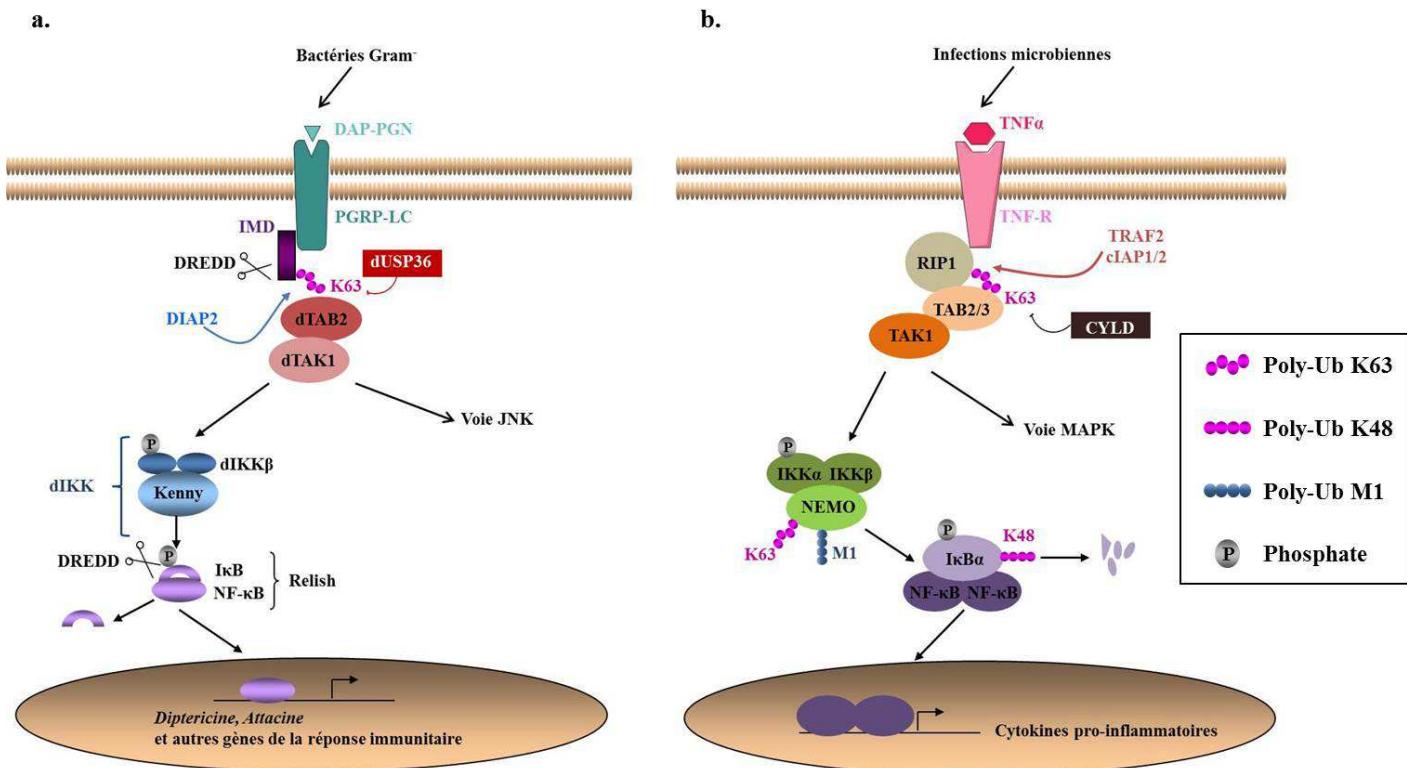
Imd est une protéine contenant un domaine DD (Death Domain) et présente quelques similarités de séquence avec la protéine RIP1 (Receptor Interacting Protein 1) des mammifères, notamment au niveau des domaines DD (Georgel et al., 2001). La protéine RIP1 contient aussi un domaine kinase, qui n'est pas essentiel pour la signalisation NF-κB et n'est pas présent chez la protéine Imd de la drosophile (Ting et al., 1996). Après stimulation par la cytokine TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor), RIP1 et TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor 2) sont recrutées par le récepteur TNF-R1. TRAF2 est une E3 ubiquitine ligase au domaine RING, qui s'associe au complexe E2 Ubc13/Ueav1A pour ubiquitiner RIP1 par des chaînes de poly-ubiquitine K63 (Deng et al., 2000; Kanayama et al., 2004). Néanmoins, des études plus récentes suggèrent que ce sont plutôt les ubiquitine ligases c-IAP1 et c-IAP2 (cellular Inhibitor of Apoptosis 1 et 2), recrutées par TRAF2, qui induisent la poly-ubiquitination de RIP1 (Bertrand et al., 2008; Dynek et al., 2010; Varfolomeev et al., 2007). Ces chaînes K63 d'ubiquitine sont hydrolysées par la déubiquitinase CYLD (Knox et al., 2011). Chez la drosophile, Imd interagit avec dFADD (Fas Associated via Death Domain), qui se lie à la caspase DREDD (Death Related ced-3/Nedd2-like protein) (Hu and Yang, 2000). Le recrutement de la caspase DREDD et de son adaptateur dFADD provoque le clivage de la protéine Imd par DREDD (Hu and Yang, 2000; Paquette et al., 2010). Ce clivage permet l'exposition du motif très conservé IBM (IAP-Binding Motif) du côté N-terminal de Imd, qui entraîne l'association de Imd clivée avec l'ubiquitine ligase E3 DIAP2 (Drosophila Inhibitor of Apoptosis 2). Ainsi, Imd est poly-ubiquitinée K63 par DIAP2 (Paquette et al., 2010). La déubiquitinase dUSP36 hydrolyse les chaînes d'ubiquitine K63 liées à Imd et empêche ainsi l'activation constitutive de la voie IMD en absence d'infection (Thevenon et al., 2009).

Chez les mammifères, les formes ubiquitinées de RIP1 lient et activent le complexe de kinase TAB/TAK1, grâce aux capacités de TAB2 et TAB3 de lier des chaînes d'ubiquitine K63 par leur UBD (Kanayama et al., 2004). Chez la drosophile, l'homologue dTAB2 contient le domaine conservé de liaison aux chaînes d'ubiquitine K63 et est requis pour la signalisation IMD (Kaneko and Silverman, 2005). Il est donc probable que dTAB2 joue un rôle d'échafaudage similaire. La kinase dTAK1 est nécessaire pour l'activation des voies NF-κB et JNK/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), après la stimulation par des PGN (Boutros et al., 2002; Silverman et al., 2003; Vidal et al., 2001). En effet, dTAK1 est strictement nécessaire pour l'expression de peptides antimicrobiens *via* la voie NF-κB et pour l'expression d'autres gènes de la réponse immunitaire régulés par la voie JNK, comme ceux impliqués dans la réparation tissulaire (Galko and Krasnow, 2004; Silverman et al., 2003).

Comme nous l'avons déjà vu, chez les mammifères, TAK1 est le point de branchement entre les voies NF-κB et MAPK. En effet, la protéine humaine TAK1 phosphoryle et active directement le complexe de kinases IKK (IκB Kinase) et MKK6 *in vitro* (Wang et al., 2001). En aval de TAK1, la signalisation du TNF-R rejoint celle des TLRs, que nous avons déjà décrit dans le paragraphe «Les voies Toll de la drosophile et TLRs des mammifères».

Chez la drosophile, le complexe de kinase IKK agit en aval de dTAK1 et est composé d'au moins deux sous-unités, dIKK $\beta$  (ou ird5) et dIKK $\gamma$  (ou Kenny). La sous-unité dIKK $\beta$  de la mouche est un homologue des sous-unités catalytiques humaines IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  (Silverman and Maniatis, 2001). La cible du complexe dIKK de *Drosophila* est le précurseur NF-κB Relish (Rel). Relish, comme les protéines NF-κB p100 et p105 des mammifères, est composée d'un domaine Rel et d'une partie inhibitrice IκB-like riche en ankirine (Dushay et al., 1996). La phosphorylation de Relish par dIKK entraîne le clivage de la partie IκB par la caspase DREDD et le domaine facteur de transcription NF-κB peut transloquer dans le noyau, où il régule l'expression de nombreux gènes (Silverman et al., 2000; Stoven et al., 2000). La protéine IκB $\alpha$  des mammifères est poly-ubiquitinée par des chaînes K48 pour être dégradé par le protéasome (Chen et al., 1995) (Fig. 17).

La voie IMD régule ainsi, entre autres, l'expression de peptides antimicrobiens comme *l'attacine* et la *diptéricine* (Lemaitre et al., 1995; Lemaitre et al., 1997). Des études transcriptomiques ont révélé que cette voie contrôle également l'expression de 250 gènes impliqués dans la réponse immunitaire et la réponse au stress (De Gregorio et al., 2001; De Gregorio et al., 2002; Irving et al., 2001). Cependant, contrairement à la voie Toll, la voie IMD ne semble pas impliquée dans le développement embryonnaire car la délétion des éléments de la voie sont parfaitement viables (Lemaitre and Hoffmann, 2007).



**Figure 17. Comparaison entre la voie IMD de la drosophile et la voie du récepteur au TNF chez les mammifères.** (a) Chez la drosophile, la voie IMD est activée par la reconnaissance de DAP-PGN de bactéries à Gram négatif par le récepteur transmembranaire PGRP-LC. La protéine Imd est ensuite clivée par la caspase DREDD et Imd clivée est activée par poly-ubiquitination K63 (Poly-Ub K63) catalysée par l'ubiquitine ligase DIAP2. La déubiquitinase dUSP36 empêche l'activation constitutive de la voie en hydrolysant les chaînes d'ubiquitine K63 de Imd. Ensuite, la kinase dTAK1 est recrutée via son adaptateur dTAB2, pour activer distinctement la voie JNK et la voie NF-κB. Dans la voie NF-κB, dTAK1 phosphoryle et active le complexe dIKK, qui phosphoryle à son tour la sous-unité inhibitrice IκB de Relish. IκB phosphorylée est alors clivée par DREDD et le facteur de transcription NF-κB peut transloquer dans le noyau, pour induire l'expression de nombreux gènes de la réponse immunitaire, dont ceux codant pour les peptides antimicrobiens attacine et diptéricine. (b) Chez les mammifères, le récepteur au TNF (TNF-R) est activé par la reconnaissance du TNF $\alpha$ , exprimée en réponse à des infections microbiennes. Cette activation entraîne la poly-ubiquitination K63 de la protéine RIP1 par les ubiquitine ligases TRAF2 ou cIAP1/2. CYLD est la déubiquitinase capable d'hydrolyser ces chaînes d'ubiquitine K63 pour réguler négativement la voie du TNF-R. Ensuite, TAK1 et ses protéine adaptatrices TAB2 et 3 sont recrutées pour activer la voie MAPK ou NF-κB. Cette dernière passe par la phosphorylation du complexe IKK et la sous-unité  $\gamma$  (ou NEMO) est poly-ubiquitinée K63 et par des chaînes linéaires (Poly-Ub M1). A son tour, IKK phosphoryle la sous-unité inhibitrice IκB $\alpha$ , ce qui déclenche son ubiquitination K48 (Poly-Ub K48) et sa dégradation par le protéasome. Finalement, les facteurs NF-κB libérés se dirigent vers le noyau pour activer une réponse inflammatoire.

### c. La régulation par ubiquitination des voies Toll et IMD de drosophile

Ces dernières années, les études sur les voies de signalisation Toll et IMD ont montré qu'elles étaient finement régulées par ubiquitination. En effet, nous avons déjà évoqué l'exemple de la poly-ubiquitination K63 de Imd catalysée par l'ubiquitine ligase DIAP2 et hydrolysée par la déubiquitinase dUSP36 (Paquette et al., 2010; Thevenon et al., 2009) (cf. paragraphe «Les voies IMD de la drosophile et TNF-R des mammifères»). Mais, d'autres études ont permis de suspecter ou de montrer le rôle de l'ubiquitination et de la sumoylation dans les voies immunitaires IMD et Toll.

#### L'ubiquitination dans la voie IMD

Tout d'abord, un cible a permis d'isoler deux mutations provoquant une perte de fonction partielle dans le gène *SkpA*, qui induisent constitutivement l'expression du gène codant pour le peptide antimicrobien diptéricine, sans affecter l'expression du peptide antifongique drosomycine (Khush et al., 2002). Chez les mammifères et la levure, l'homologue de SkpA est la sous-unité Skp1 (S-phase kinase-associated protein 1) du complexe ubiquitine ligase SCF (Skp1/Cullin/F-box), qui ciblent les substrats vers la dégradation protéasomale (Zheng et al., 2002). De plus, les mutations affectant les autres sous-unités du complexe SCF (Slimp et dCullin1) de la drosophile ou le protéasome induisent également l'expression de la *diptéricine* (Khush et al., 2002). Comme l'extinction génique de *SkpA* et *Slimp* en cellules de drosophile entraîne une stabilisation des formes entières et clivées de Relish, il est probable que le facteur de transcription Relish soit régulé par le protéasome et donc, hypothétiquement, poly-ubiquitiné par des chaînes K48. En outre, une récente étude a identifié dRYBP (Ring and YY1 Binding Protein), qui contient un domaine de liaison à l'ubiquitine, comme un régulateur négatif de la voie IMD (Aparicio et al., 2013). En effet, dRYBP est nécessaire pour l'inhibition de la production de AMPs en réponse à l'infection. De plus, des expériences d'épistasie suggèrent que dRYBP agit en amont ou au niveau de SkpA. Les auteurs proposent que dRYBP fonctionne avec SkpA pour favoriser la dégradation protéasomale de Relish dépendante de SCF.

Par ailleurs, comme dans les voies NF-κB des mammifères, les homologues de la drosophile des «ubiquitin conjugating» E2 dUbc13 (Ubiquitin conjugating enzyme 13) et dUEV1a (Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant 1a) sont nécessaires pour l'activation de la

protéine dTAK1 et du complexe dIKK (Zhou et al., 2005b). En revanche, l'inhibiteur du protéasome ne bloque pas l'activation de dIKK et l'étude structurale du complexe E2 Ubc13/UEV1a humain et de la levure montre que ce complexe ne peut assembler que des chaînes de poly-ubiquitine K63 (Stoven et al., 2003; VanDemark et al., 2001). Chez les mammifères, TRAF6, en association avec Ubc13/UEV1a, s'auto-ubiquitine, ce qui entraîne son activation et celle de la kinase TAK1 (Deng et al., 2000). Chez la drosophile, le plus proche analogue de TRAF6 est dTRAF2, qui ne semble pas être un élément essentiel de la voie IMD. En revanche, des expériences d'épistasie ont montré que dUBC13 et dUEV1a agissent en aval de la protéine Imd mais en amont de dTAK1 (Zhou et al., 2005b). Donc, il est possible que la transduction du signal de la protéine Imd à dTAK1 dépende de l'intervention d'une ubiquitine ligase E3, restant à identifier, associée au complexe E2 dUbc13/dUEV1a.

En outre, l'ubiquitine ligase POSH (Plenty Of SH3) contrôle les voies IMD et JNK. En effet, dans des mouches déficientes pour *POSH*, l'activation de la voie JNK et l'expression de gènes dépendants de Relish, comme *attacine* et *diptéricine*, sont retardés et soutenus. Plus particulièrement, le domaine RING de POSH, qui possède l'activité ubiquitine ligase, est essentiel pour l'interruption de l'activation de la voie JNK (Tsuda et al., 2005). Les auteurs ont également observé que POSH interagit avec la protéine dTAK1, point de branchement entre les voies NF-κB et JNK, et qu'elle favorise l'ubiquitination et la dégradation de dTAK1. Ces résultats sont concordants avec l'observation d'une rapide interruption de la voie JNK causée par la dégradation protéasomale de dTAK1 (Park et al., 2004). De plus, POSH s'auto-ubiquitine et entraîne ainsi sa propre dégradation protéasomale, ce qui peut renforcer l'hypothèse d'une activité ubiquitine ligase associée au protéasome (Xu et al., 2003). Donc, POSH est impliquée dans un mécanisme de rétrocontrôle négatif des voies JNK et NF-κB, probablement en ubiquitinant dTAK1 par des chaînes K48 et entraînant ainsi sa dégradation par le protéasome.

Chez les mammifères, CYLD est une déubiquitinase qui régule négativement les voies du TNF-R, en induisant la déubiquitination des protéines RIP1, TRAF2, TRAF6 et NEMO (Courtois et al., 2008 ; Wang et al., 2004 ;Chen et al., 2012). Chez la drosophile, l'expression défectiveuse de *dCYLD<sup>f00814</sup>*, mutation de *dCYLD* qui ne permet pas l'expression des transcrits de ce gène, entraîne une résistance réduite aux infections bactériennes, qui est rétablie par la complémentation par *dCYLD*. Ce résultat peut néanmoins être la conséquence indirecte d'une forte altération de la morphologie et de la physiologie du corps gras des mouches

*dCYLD*<sup>f00814</sup>. En outre, les mouches homozygotes *dCYLD*<sup>f00814</sup> sur-expriment constitutivement la *diptéricine* comparé aux mouches WT, mais aucune différence significative n'est observée en réponse à l'infection par *E. coli*. Par ailleurs, l'expression de la *drosomycine* n'est jamais affectée par l'expression de *dCYLD*<sup>f00814</sup>, ce qui suggère que dCYLD ne régule pas la voie Toll. Par la technique de double hybride, il a été montré que dCYLD interagit avec Kenny, l'équivalent de NEMO chez les mammifères, mais pas avec les autres éléments de la voie. Cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation à partir de lysats de cellules S2 (Tsichritzis et al., 2007). Donc, en faisant le parallèle avec son rôle chez les mammifères, dCYLD pourrait réguler négativement la voie IMD en hydrolysant les chaînes de poly-ubiquitine K63 hypothétiquement liées à Kenny.

L'interactome de la voie IMD a souligné que la sumoylation régulait également la voie IMD (Fukuyama et al., 2013). La protéine dUBC9 est une enzyme «SUMO conjugating enzyme» E2, qui facilite la sumoylation des protéines chez la drosophile. La perte de fonction de dUBC9 *in vivo* entraîne une sensibilité aux infections par *E. coli* et une diminution de l'expression de *l'attacine*, en réponse à l'infection, confirmant ainsi l'importance de la sumoylation dans la voie IMD. De plus, la sous-unité dIKK $\beta$  du complexe de kinase dIKK est modifiée par la protéine ubiquitin-like SUMO. La stimulation de la voie IMD par des *E. coli* tuées par choc thermique entraîne une augmentation dans le temps de la sumoylation de dIKK $\beta$ , alors que la sumoylation de la forme mutée dIKK $\beta$ -K152A reste au niveau des cellules non-induites. De plus, la perte d'activation de la voie IMD provoquée par l'extinction de *dIKK $\beta$*  est restaurée par la sur-expression de la forme sauvage dIKK $\beta$  mais pas par celle de la forme mutée dIKK $\beta$ -K152A, *in vivo* et *in cellulo* (Fukuyama et al., 2013). Ces résultats montrent que la sumoylation de dIKK $\beta$  est nécessaire à l'activation de la voie IMD.

### L'ubiquitination dans la voie Toll

La protéine Pellino, connue pour interagir avec Pelle, a été identifiée pour être un régulateur positif de la voie Toll (Grosshans et al., 1999). En effet, les drosophiles mutantes pour *Pellino* ont une expression réduite de *Drosomycine* et survivent moins bien à une infection par des bactéries à Gram positif (Haghayeghi et al., 2010). Comme, chez les mammifères, une protéine homologue de Pelle, IRAK1 (IL-1R-Associated Kinase 1), est poly-ubiquitinée par Pellino, il est supposé que chez la drosophile, Pelle est également ubiquitinée par Pellino (Moynagh, 2009).

En outre, l'enzyme dUBC9 est également impliquée dans la régulation de la voie Toll de *Drosophila*. En effet, il a été démontré, dans un premier temps, que dUBC9 permet la sumoylation de Dorsal (Bhaskar et al., 2000). En cellules, dUBC9 empêche la séquestration de Dorsal par Cactus, permettant à Dorsal d'entrer dans le noyau pour induire l'expression de gènes de l'immunité. La sumoylation de Dorsal se fait sur sa lysine 382 et elle est contre-balancée par la cystéine protéase Ulp1 (Bhaskar et al., 2002). Dans cette étude, il est observé que dUBC9 est nécessaire à l'expression de la *drosomycine*, en réponse à la stimulation par LPS. Cependant, une autre étude suggère que dUBC9 contribue à la régulation négative de la voie Toll. En effet, les mutants *dUBC9* présentent de fortes anomalies dans l'hématopoïèse (sur-abondance de lamellocytes, défauts mitotiques dans les tissus hématopoïétiques des larves...) et une expression constitutive de *drosomycine* (Chiu et al., 2005). Les défauts des mutants *dUBC9* dépendent de la présence des facteurs NF-κB Dorsal et Dif, ce qui suggère un rôle de dUBC9 dans la voie Toll. Ensuite, il a été observé que dUBC9 est essentiel pour maintenir un niveau stable de Cactus (Paddibhatla et al., 2010). Ce résultat est en adéquation avec le rôle de la sumoylation de IκB $\alpha$  chez les mammifères. En effet, UBC9 catalyse l'ajout d'une protéine SUMO sur IκB $\alpha$  (Desterro et al., 1998). Alors que l'activation de la voie NF-κB est permise par la poly-ubiquitination K48 et la dégradation protéasomale de IκB $\alpha$ , la sumoylation par UBC9 du même résidu lysine de IκB $\alpha$  bloque sa dégradation et, par conséquent, augmente la séquestration de NF-κB dans le cytoplasme et contribue ainsi à la régulation négative de la voie NF-κB (Desterro et al., 1998; Hay et al., 1999; Tashiro et al., 1997).

### 3. Les protéines PGRPs de la drosophile

Initialement, les protéines PGRPs ont été isolées chez le ver à soie *Bombyx mori*, par leur capacité à lier des PGN (Yoshida et al., 1996). Chez la drosophile, les membres de la famille des PGRPs (Peptidoglycan Recognition Proteins) interviennent en amont des voies Toll et IMD. Les protéines PGRPs sont les seules protéines «senseurs» de PGN connues à ce jour chez la drosophile, alors que la détection des PGN chez les vertébrés est effectuée par les récepteurs TLRs, les protéines NODs et les protéines PGRPs (Boneca, 2009; Charroux et al., 2009; Dziarski and Gupta, 2006; Girardin and Philpott, 2004). Comme nous l'avons déjà vu, les voies Toll et IMD sont stimulées respectivement par des bactéries à Gram positif et à

Gram négatif. Cette discrimination provient du fait que les PGN des bactéries à Gram négatif contiennent en troisième position l'acide aminé DAP, alors que ceux des bactéries à Gram positif ont généralement une lysine (Lys) à cette position (Leulier et al., 2003). Il est important de noter que bien qu'elle soit une bactérie à Gram positif, *Bacillus subtilis* possède des DAP-PGN et active donc la voie IMD (Leulier et al., 2003). La famille des gènes *PGRP* est conservée des insectes aux mammifères et implique quatre gènes chez l'Homme (Kang et al., 1998; Liu et al., 2001). Chez la drosophile, treize gènes codant pour des gènes *PGRP* ont été identifiés (Kurata, 2004; Werner et al., 2000). La famille PGRP est divisée en deux classes, selon que la protéine soit codée par des transcrits courts (PGRP-S), composés d'environ 200 acide aminés, ou longs (PGRP-L) avec au moins 400 acides aminés. Des insectes aux mammifères, ces protéines ont un domaine PGRP conservé dans leur région C-terminale. Ce domaine possède des similarités de séquences avec les amidases lysozymes de bactériophages, ce qui suggère une origine ancestrale bactérienne de la famille des PGRPs (Kang et al., 1998). Pour certaines PGRPs de drosophile, comme PGRP-SC1 et PGRP-LB, la fonction amidase est conservée (Kim et al., 2003; Mellroth and Steiner, 2006). Dans d'autres, comme PGRP-SA, -SD, -LE ou -LC, l'absence du résidu cystéine critique dans les domaines PGRPs a entraîné la perte de la fonction enzymatique. Il est admis que les PGRPs sans activité amidase servent de récepteurs pour la reconnaissance de PGN (Maillet et al., 2008). En dégradant les PGN, les PGRPs ayant une activité amidase pourraient contrôler l'intensité de la réponse immunitaire chez la drosophile et agissent, ainsi, comme des enzymes de détoxicifications (Bischoff et al., 2006; Zaidman-Remy et al., 2006). Cependant, chez les mammifères, cette activité est aussi bactéricide et est essentielle dans la défense contre les pathogènes (Dziarski and Gupta, 2006). En outre, les protéines PGRP-S de drosophile possèdent un peptide signal, qui leur permet d'être sécrétées, alors que les membres de PGRP-L possèdent un ou deux domaines PGRPs. Aussi bien les PGRP-S que les PGRP-L contiennent une séquence N-terminale unique pour un PGRP donné (Charroux et al., 2009). Par ailleurs, les protéines PGRPs diffèrent selon leur localisation. Elles peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire (e.g. PGRP-SA), membranaires (e.g. PGRP-LC, PGRP-LF) ou bien intracellulaires (e.g. PGRP-LE).

Chez la mouche, les gènes *PGRP* sont exprimés dans les tissus immunitaires, tels que les hémocytes, le corps gras, l'intestin, la trachée et l'épiderme. La majorité des membres de PGRP-S sont induits en réponse à l'infection bactérienne, alors que les protéines PGRP-L sont principalement exprimés constitutivement (Kurata, 2004). Chez les mammifères, les

quatre gènes *PGRP* sont exprimés dans les tissus immunitaires, comme la moelle épinière, le foie, l'œsophage et l'épithélium buccal (Liu et al., 2001; Lo et al., 2003).

#### a. Les protéines PGRP-SA et PGRP-SD

Un crible de mutants a identifié PGRP-SA comme une protéine nécessaire à l'activation de la voie Toll en réponse aux infections par des bactéries à Gram positif (Michel et al., 2001). Ce phénotype est sauvé par le transfert d'hémolymphé sauvage dans le mutant *PGRP-SA*. Cela suggère que PGRP-SA, comme la majorité des PGRPs, est sécrétée et qu'elle permet l'activation de la voie Toll. La protéine PGRP-SA possède un peptide signal, ce qui conforte l'hypothèse de sa sécrétion (Kurata et al., 2006). En revanche, la stimulation de la voie Toll par des infections fongiques n'est pas bloquée dans le mutant *PGRP-SA*, ni celle de la voie IMD en réponse aux bactéries à Gram négatif (Michel et al., 2001). Ce résultat, d'une part, confirme que les voies IMD et Toll sont induites de façon indépendante et, d'autre part, prouve que l'activation de la voie Toll par les champignons ou les bactéries à Gram positif se fait par deux mécanismes distincts. En plus de son rôle comme PRR, PGRP-SA a une activité carboxypeptidase (Chang et al., 2004). Pour activer la voie Toll, PGRP-SA et GNBP-1 coopèrent pour détecter les bactéries à Gram positif (Gobert et al., 2003) (Fig. 15). En effet, Gobert *et al.* ont proposé que GNBP-1, qui partage des homologies de séquences avec les glucanases, pourrait dégrader par son activité catalytique les PGN de type Lys, pour qu'ils soient reconnus par PGRP-SA. Par ailleurs, la fonction de PGRP-SA est partiellement redondante à celle de PGRP-SD (Bischoff et al., 2004). D'autres expériences suggèrent que PGRP-SD participent avec PGRP-SA et GNBP-1 à la détection de certaines espèces de bactéries à Gram positif, comme *Staphylococcus aureus*. En effet, PGRP-SD favorise la liaison de PGRP-SA et de GNBP-1 aux PGN et ces trois protéines forment un complexe (Wang et al., 2008). D'autre part, étant un activateur de la voie Toll, il est prévisible que PGRP-SA lie avec une plus grande affinité les PGN de type Lys que ceux de type DAP. Effectivement, la structure minimale pour l'activation de la voie Toll par PGRP-SA est composée de deux unités GlcNAc-MurNAc liées à des tétrapeptides et covallement dimérisées par un interpeptide (Filipe et al., 2005) (Fig. 18). Cependant, les DAP-PGN peuvent aussi stimuler la voie Toll mais de façon moins intense que les Lys-PGN. Il a été montré que cette activation dépend de PGRP-SA, ce qui est cohérent avec la faible interaction entre PGRP-SA et DAP-PGN (Charroux et al., 2009). L'activation de Toll par les DAP-PGN

dépend également de PGRP-SD, ce qui n'est pas surprenant puisque cette protéine a une plus grande affinité pour les PGN du type DAP que ceux du type Lys (Leone et al., 2008).

### b. La protéine PGRP-LE

L'injection chez des mouches adultes de DAP-PGN sous forme monomérique, comme la TCT (Tracheal Cytoxin), ou polymérique déclenche une forte production de peptides antimicrobiens (Kaneko et al., 2004). Cette activation dépend de PGRP-LE qui reconnaît le DAP-PGN monomérique, et dont le domaine PGRP est sécrété dans l'hémolymphhe (Kaneko et al., 2006). Il a été observé que le double mutant *PGRP-LC/PGRP-LE* était plus sensible aux infections par *Escherichia coli* que chacun des simples mutants, indiquant que PGRP-LC et PGRP-LE pourraient avoir des rôles redondants dans la résistance aux infections par des bactéries à Gram négatif (Takehana et al., 2002). En outre, la sur-expression de PGRP-LE suffit à activer la voie IMD, de façon dépendante de PGRP-LC (Takehana et al., 2004). Dans l'hémolymphhe, PGRP-LE active également la cascade de la prophénoloxydase (caractérisée, entre autres, par la mélanisation) et apparaît donc comme le point de branchement entre la voie IMD et cette cascade protéolytique (Kurata, 2010; Takehana et al., 2002). Ce double rôle extracellulaire était inattendu car PGRP-LE ne contient pas de domaines transmembranaires prédis ni de peptide signal, ce qui favorise plutôt l'hypothèse que PGRP-LE agit de façon intracellulaire (Werner et al., 2000). De plus, bien que PGRP-LE active la voie IMD *via* PGRP-LC dans le corps gras, PGRP-LE active la voie IMD de façon autonome dans les tubes de Malpighi (jouant un rôle équivalent du rein chez les mammifères) (Takehana et al., 2004). Cette dernière observation implique donc que PGRP-LE est susceptible d'agir au niveau du cytoplasme.

Alors que la version de PGRP-LE ne contenant que le domaine PGRP fonctionne dans le compartiment extracellulaire pour faciliter la reconnaissance de PGN par PGRP-LC à la surface cellulaire, la forme entière de PGRP-LE agit comme un récepteur intracellulaire de TCT (Kaneko et al., 2006). Ce résultat coïncide avec le fait que la forme principale de PGRP-LE identifiée dans l'hémolymphhe *in vivo* est le fragment correspondant au domaine PGRP seul. Le rôle intracellulaire de PGRP-LE ne dépend pas de PGRP-LC, ce qui suppose que PGRP-LE a sa propre capacité intrinsèque d'interagir et d'activer les éléments de la voie

IMD. Cette hypothèse est renforcée par la présence d'un domaine conservé RHIM-like (RIP Homotypic Interaction Motif) dans la séquence de PGRP-LE. Ce domaine est essentiel à la régulation de la voie IMD et est présent dans le domaine cytoplasmique de PGRP-LC. Actuellement, il n'est pas évident de comprendre comment le TCT rejoint le milieu intracellulaire pour être reconnu par PGRP-LE. Il pourrait passer dans la cellule hôte par diffusion ou *via* l'implication d'un système de sécrétion de type III de bactéries (Charroux et al., 2009; Izore et al., 2011).

Une autre fonction intracellulaire a été attribuée à PGRP-LE : elle est capable de reconnaître les DAP-PGN du pathogène intracellulaire *Listeria monocytogenes* (Yano et al., 2008). Cette reconnaissance est nécessaire pour l'induction de la machinerie autophagique, qui est un processus connu de dégradation de pathogènes intracellulaires. En outre, l'induction de l'autophagie suite à la détection des bactéries par PGRP-LE ne dépend pas des voies Toll et IMD. Cela suppose donc l'existence d'une nouvelle voie responsable de cette fonction (Charroux et al., 2009; Kurata, 2010). Chez les mammifères, les protéines NOD1 et NOD2, également des détecteurs intracellulaires de PGN, sont impliqués dans l'activation de l'autophagie, en réponse à l'invasion bactérienne (Cooney et al., 2010; Oh and Lee, 2013; Travassos et al., 2010).

### c. La protéine PGRP-LF

PGRP-LF contient une courte queue cytoplasmique (23 acides aminés), un domaine transmembranaire et deux motifs extracellulaires PGRPs (LFw et LFz), qui ont de fortes similarités de séquence avec les domaines PGRPs des isoformes PGRP-LCx et PGRP-LCa. Les domaines LFw et LFz diffèrent dans leurs affinités pour les PGN. En effet, alors que le domaine z a une affinité pour plusieurs groupes de PGN, le domaine w reconnaît seulement les PGN d'*E. coli* (Persson et al., 2007). De plus, deux études indépendantes ont montré que le récepteur transmembranaire PGRP-LF lie les DAP-PGN et est un régulateur négatif de la voie IMD (Maillet et al., 2008; Persson et al., 2007). En effet, l'extinction génique de *PGRP-LF* *in vivo* suffit à activer la voie IMD. De plus, la sur-expression de PGRP-LF dans les drosophiles bloque la synthèse de peptides antimicrobiens, après une stimulation microbienne (Maillet et al., 2008). Deux modèles ont alors été proposés pour expliquer ces résultats. Le

premier propose qu'en interagissant avec PGRP-LC, PGRP-LF empêche la dimérisation spontanée de PGRP-LC et donc l'activation constitutive de la voie IMD (Maillet et al., 2008). Le modèle alternatif suggère que PGRP-LF séquestre les PGN circulants pour diminuer leur concentration endogène et donc l'activation de la voie IMD (Maillet et al., 2008; Persson et al., 2007). Finalement, une étude structurale récente montre que les domaines LFw et LFz, contrairement aux autres domaines PGRPs, n'ont pas le sillon d'accueil pour les PGN et, en conséquence, ne peuvent pas lier directement les PGN (Basbous et al., 2011). Ce dernier résultat favorise donc l'hypothèse d'une compétition entre PGRP-LF et PGRP-LCa pour lier PGRP-LCx. Cette hypothèse est renforcée par une étude qui montre que les ectodomains de PGRP-LCx et PGRP-LF interagissent, en présence ou non de TCT (Basbous et al., 2011).

#### d. Le récepteur immunitaire PGRP-LC

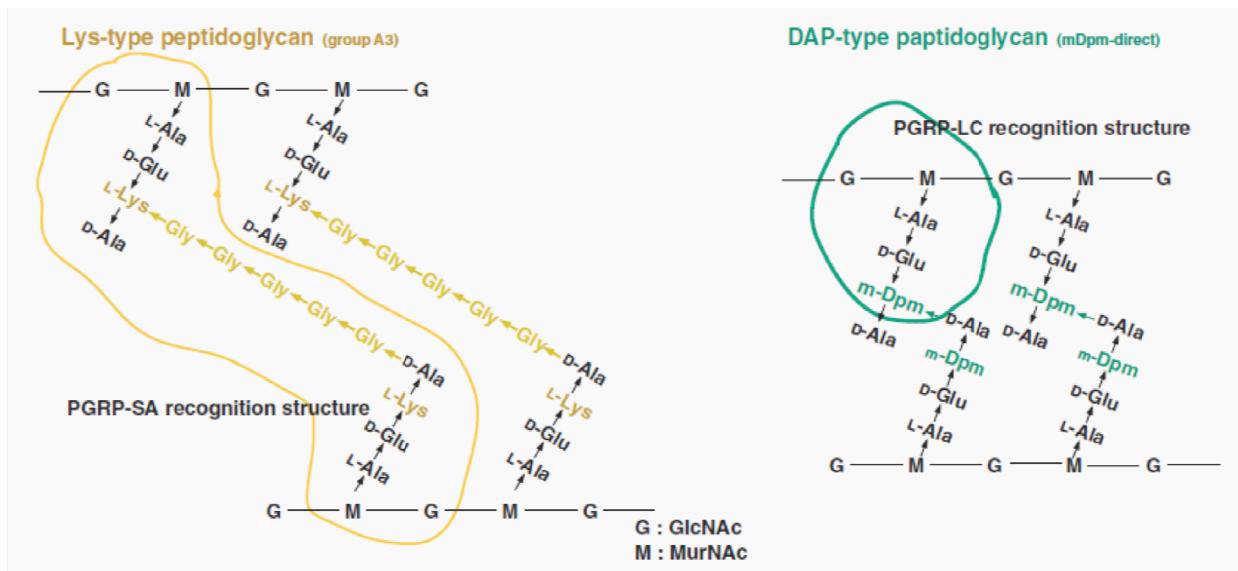
PGRP-LC est une protéine membranaire, qui serait, entre autres, nécessaire à la phagocytose des bactéries à Gram négatif par les cellules immunitaires S2 (Bergeret et al., 2008; Ramet et al., 2002). De plus, le mutant *PGRP-LC* a une résistance réduite aux bactéries à Gram négatif et des expériences d'épistasie indiquent que PGRP-LC agit en amont de la protéine adaptatrice Imd. PGRP-LC est donc nécessaire à l'activation de la voie IMD en réponse aux infections par des bactéries à Gram négatif (Choe et al., 2002; Gottar et al., 2002; Ramet et al., 2002). Cette hypothèse a ensuite été confirmée puisqu'une étude a montré que PGRP-LC était nécessaire à la reconnaissance des DAP-PGN (Kaneko et al., 2004; Leulier et al., 2003). Plus particulièrement, La structure minimale de DAP-PGN nécessaire pour l'activation de la voie IMD par PGRP-LC est GlcNAc-MurNAc liée à un tri-peptide par une liaison interne 1,6-anhydro (Stenbak et al., 2004) (Fig. 18). Or, comme la sensibilité aux infections du mutant *PGRP-LC* est moins forte que celle du mutant *kenny* (élément de la voie IMD en aval de la protéine Imd), il a été proposé qu'un activateur alternatif, par exemple PGRP-LE, pouvait également induire la voie IMD (Gottar et al., 2002).

Grâce à l'épissage alternatif, le gène *PGRP-LC* code pour au moins trois isoformes (PGRP-LCa, x et y), qui possèdent les mêmes domaines cytoplasmiques en N-terminal et transmembranaires mais diffèrent par leur domaine extracellulaire (Werner et al., 2003). Le rôle de chaque isoforme dans la réponse immunitaire de la mouche a été examinée grâce à des ARN interférents spécifiques d'une isoforme donnée de PGRP-LC (Kaneko et al., 2004).

Ainsi, il a été observé que PGRP-LCx, mais pas PGRP-LCa et PRP-LCy, est nécessaire à l'activation de la voie IMD par l'ajout de PGN polymérique de *E. coli*, alors que le PGN monomérique TCT requiert la présence des isoformes PGRP-LCa et PGRP-LCx pour induire la voie (Kaneko et al., 2004). En outre, les isoformes de PGRP-LC peuvent former entre elles des homo- ou hétérodimères et, grâce aux diverses combinaisons possibles, plusieurs types de récepteurs de PGN sont créés (Choe et al., 2005; Kaneko et al., 2004). Par exemple, il a été observé que la présence de TCT, mais pas celle de PGN polymérique, entraîne la dimérisation des isoformes PGRP-LCa et PGRP-LCx (Mellroth et al., 2005). Comme PGRP-LCa ne lie pas les PGN, il est admis que c'est la liaison de PGRP-LCx aux PGN qui induit la formation de l'hétérodimère PGRP-LCx/LCa (Mellroth et al., 2005). De son côté, l'homodimère de PGRP-LCx permettrait la reconnaissance de PGN polymérique (Kaneko et al., 2006). Le domaine cytoplasmique de PGRP-LC est essentiel pour la formation de dimères et il est nécessaire et suffisant pour initier la voie de signalisation IMD (Choe et al., 2005). En outre, des études structurales ont identifié la sérine 391 de PGRP-LC comme un acide aminé indispensable pour l'hétérodimérisation (Chang et al., 2006; Lim et al., 2006). Comme pour PGRP-LE, un domaine RHIM-like a été identifié dans le domaine cytoplasmique de PGRP-LC (Kaneko et al., 2006). Etonnamment, ce domaine est nécessaire pour la transduction du signal mais pas pour l'interaction du récepteur avec Imd, ce qui amène à penser que l'interaction de PGRP-LC avec Imd n'est pas indispensable à la signalisation. De plus, le domaine RHIM-like n'est pas essentiel pour l'homodimérisation de PGRP-LCx, ce qui suggère que ce domaine permet l'interaction du récepteur PGRP-LC avec un composant inconnu de la voie IMD indispensable pour la transduction du signal (Kaneko et al., 2006).

En parallèle de l'induction de la voie IMD par la reconnaissance de DAP-PGN par des dimères de PGRP-LC, l'équipe du Dr Tang propose un modèle où le clivage protéolytique de PGRP-LC permet l'activation de la voie IMD. En effet, ils ont observé que le récepteur est clivé en réponse aux infections par des bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *Salmonella*) mais pas par les Gram positifs (*Staphylococcus*) (Schmidt et al., 2008). De façon intéressante, l'intégrité de PGRP-LC n'est pas affectée par l'infection naturelle d'*E. coli* déficientes pour les protéases (souche BL21) ou tuées par la chaleur (Schmidt et al., 2011; Schmidt et al., 2008). En outre, PGRP-LC sans son ectodomaine (domaine extracellulaire) est constitutivement actif en absence d'infection, alors que le domaine cytoplasmique seul de PGRP-LC n'est pas fonctionnel (Schmidt et al., 2008). Ainsi, la localisation membranaire de PGRP-LC est nécessaire pour la signalisation de la voie IMD et/ou l'ectodomaine régule

négativement la voie pour empêcher son activation constitutive en absence d'infection (Schmidt et al., 2008). Cette hypothèse permettrait d'expliquer en partie comment les voies immunitaires distinguent les microbes pathogéniques des non-pathogéniques (e.g. bactéries commensales), alors qu'ils disposent des mêmes motifs PAMPs. Dans ce cas, le relargage des protéases microbiennes pourrait être caractéristique des microorganismes virulents et permettrait l'activation de PGRP-LC, et donc de la voie IMD, en réponse à la pathogénicité. Les auteurs imaginent que ces protéases pourraient aussi être impliquées dans la génération de DAP-PGN. Ce résultat rappelle le cas de la protéase Persephone, impliquée dans la cascade protéolytique activant le ligand Spärtle. En effet, Persephone est clivée par des protéases de champignons ou de bactéries à Gram positif (El Chamy et al., 2008; Gottar et al., 2006) (Fig. 15).



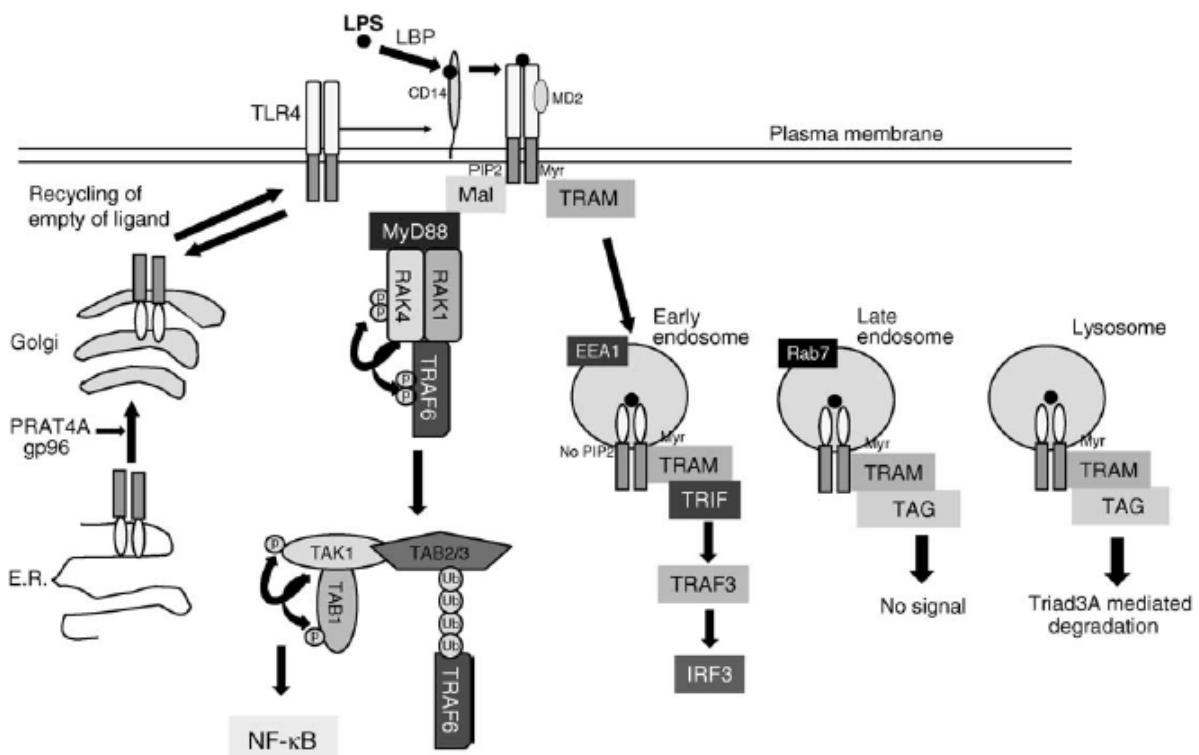
**Figure 18. Les structures des différents peptidoglycans.** Le peptidoglycane (PGN) est un polymère de N-acétyl-glucosamine (G) et d'acide N-acétyl-muramique (M) réticulé par des petits peptides. La structure des PGN est très similaire dans toutes les bactéries, mais elles diffèrent dans la composition en acides aminés, selon l'espèce bactérienne. Les bactéries à Gram négatif possèdent des PGN de type DAP (structure de droite), alors que la majorité des bactéries à Gram positif ont le plus souvent des PGN avec une lysine en troisième position et un pont inter-peptidique (structure de gauche). Les structures minimales nécessaires à la reconnaissance des Lys-PGN et des DAP-PGN respectivement par les protéines PGRP-SA et PGRP-LC sont encerclées. (Kurata et al., 2006)

#### 4. L'endocytose des récepteurs immunitaires

##### a. Endocytose du récepteur TLR4 des mammifères

Chez les mammifères, la localisation subcellulaire et le trafic des TLRs dans la cellule est un mécanisme primordial pour permettre la détection des ligands par ces récepteurs. Actuellement, les TLRs sont divisés en deux groupes, selon leur localisation subcellulaire (McGettrick and O'Neill, 2010). Dans le premier groupe, TLR1, 2, 4, 5 et 6 sont tous présents à la surface cellulaire, où ils détectent des structures lipidiques (LPS, notamment) de bactéries ou, dans le cas de TLR5, la protéine flagelline. Le second groupe comprend les récepteurs intracellulaires TLR3, 7, 8 et 9, qui reconnaissent les acides nucléiques. On constate que les TLRs du premier groupe reconnaissent des marqueurs à la surface des pathogènes susceptibles d'être présents dans le milieu extracellulaire, alors que ceux du second groupe reconnaissent des acides nucléiques provenant des génomes de bactéries ou de virus et susceptibles d'être introduits dans le milieu intracellulaire. Le trafic de certains TLRs peut également empêcher une sur-activation de la voie de signalisation TLR. A titre d'exemple, TLR4 reconnaît des LPS bactériens et la réactivité au LPS varie en fonction de la quantité de TLR4 à la surface cellulaire. La quantité de TLR4 membranaire dépend de son trafic à la membrane depuis le Golgi et de son internalisation depuis la membrane jusqu'aux endosomes (Fig. 19). Au repos, TLR4 est situé dans le Golgi et à la membrane des monocytes humains (Husebye et al., 2006; Latz et al., 2002). Des études de microscopie confocale ont révélé que TLR4 et des protéines régulatrices oscillent rapidement entre la membrane et le Golgi (Latz et al., 2002; Thieblemont and Wright, 1999). TLR4 fluctue entre ces deux compartiments jusqu'à ce qu'il soit maintenu à la membrane par les LPS, pour permettre la signalisation *via* MyD88 (Lu et al., 2008). Par ailleurs, Tanimura *et al.* ont observé que le recrutement de LPS par TLR4 induit la translocation du récepteur aux endosomes précoces (Tanimura et al., 2008). TLR4 est ubiquitiné et cette ubiquitination entraîne sa dégradation (Husebye et al., 2006). Mais, le rôle de l'endocytose de TLR4 n'est pas seulement de provoquer sa dégradation par les lysosomes. En effet, des recherches plus récentes montrent que l'internalisation de TLR4 est nécessaire pour une signalisation plus complète. L'inhibition de l'internalisation de TLR4 dans les macrophages n'a pas d'effet sur la signalisation de la voie NF-κB (production de cytokines pro-inflammatoires *via* MyD88) mais abolit la signalisation par TRAM/TRIF (production d'interférons de type 1) (Kagan et al., 2008). En outre, TRIF, qui est exprimé de façon diffuse dans le cytosol au repos, est relocalisé au niveau des radeaux

lipidiques de la membrane et des endosomes précoce, après stimulation par les LPS (Honda et al., 2004; Tanimura et al., 2008; Wong et al., 2009). De même, au repos, TRAM est situé à la membrane et aux endosomes précoce et l'induction par les LPS entraîne la translocation de TRAM membranaire aux endosomes précoce, où il colocalise avec TLR4 (Kagan et al., 2008; Palsson-McDermott et al., 2009; Rowe et al., 2006).



**Figure 19. L'activation des voies de signalisation par TLR4 dépend de sa localisation cellulaire.** Au repos, TLR4 oscille entre le Golgi et la membrane cellulaire. L'activation par les LPS le maintient à la membrane pour activer la voie NF-κB via MyD88, qui va permettre la production de cytokines pro-inflammatoires. La reconnaissance des LPS entraîne également son endocytose. A partir des endosomes précoce, TLR4 active une autre voie de signalisation, dépendante de TRAM et TRIF, pour la production d'interférons de type 1. Alternativement, TLR4 peut être ubiquitiné pour suivre la voie de dégradation lysosomale. (McGettrick and O'Neill, 2010)

**b. Endocytose des récepteurs TNF-R des mammifères**

Chez les mammifères, les activités biologiques du TNF sont régulées par deux récepteurs membranaires TNF-R distincts. Contrairement à TNF-R1, le récepteur TNF-R2 ne contient pas de domaine de mort (DD) et ne peut pas transmettre des signaux d'apoptose.

Au même titre que TLR4, le récepteur TNF-R1 peut induire des voies de signalisation différentes, selon sa localisation subcellulaire. En effet, alors qu'il induit une réponse non-apoptotique depuis la surface cellulaire en activant les voies NF-κB et JNK, TNF-R1 est également internalisé et transmet des signaux pro-apoptotiques depuis les compartiments intracellulaires (Tchikov et al., 2011). En effet, après la liaison du ligand, le domaine DD de TNF-R1 recrute la protéine TRADD (TNF-R-Associated Death Domain) (Hsu et al., 1996a). La protéine TRADD va alors fonctionner comme une plateforme d'assemblage et le point de bifurcation de deux voies de signalisation. D'une part, l'interaction de TRADD avec RIP1 et TRAF-2 conduit à l'activation des voies NF-κB et JNK, assurant ainsi une réponse pro-inflammatoire (Hsu et al., 1996b). D'autre part, TRADD peut recruter FADD pour former le complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex). A son tour, FADD recrute la caspase-8 et induit une cascade de signalisation apoptotique, impliquant l'enzyme endo-lysosomale A-SMase (Acid Sphingomyelinase) (Mahul-Mellier et al., 2008; Wiegmann et al., 1999). La délétion du domaine TRID (TNF-R1 Internalization Domain) de la queue cytoplasmique de TNF-R1 empêche l'internalisation du récepteur. De plus, il a été observé que la perte du domaine TRID empêchait le recrutement par TNF-R1 des protéines TRADD et caspase-8 mais pas celui de RIP1 et TRAF2 (Schneider-Brachert et al., 2004). Donc, l'internalisation de TNF-R1 est cruciale pour la signalisation apoptotique, mais pas pour l'induction des voies NF-κB et JNK. Finalement, un modèle a été proposé, dans lequel la signalisation de TNF-R1 implique l'assemblage de deux complexes de signalisation moléculairement et spatialement distincts, qui activent séquentiellement NF-κB et les caspases (Micheau and Tschopp, 2003). Dans ce modèle, TNF-R1 recrute, à la surface cellulaire, RIP1, TRAF2 et TRADD dans les quelques minutes suivant la liaison au TNF. Ces trois protéines sont ubiquitinées et se dissocient du récepteur, après son internalisation. Depuis les endosomes, ce complexe recrute ensuite FADD et la caspase-8 pour former un deuxième complexe de signalisation. Plusieurs études confirment l'existence de deux complexes de signalisation spatialement différents (Edelmann et al., 2011; Neumeyer et al., 2006; Schneider-Brachert et al., 2006; Schneider-Brachert et al., 2004).

Après la liaison du ligand, le récepteur TNF-R2 internalise également, de manière dépendante de la clathrine, colocalise avec la protéine Rab7, marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes, et entre dans la voie de dégradation lysosomale (Fischer et al., 2011). Cette étude a identifié un motif di-leucine dans le domaine cytoplasmique de TNF-R2 nécessaire à son internalisation. La mutation de ce motif empêche l'internalisation du récepteur mais n'affecte pas l'induction de la voie NF-κB, ce qui suggère que l'internalisation de TNF-R2 n'est pas requise pour cette signalisation. Les auteurs proposent que l'endocytose de TNF-R2 sert principalement à limiter la réponse au TNF par ce récepteur.

### c. Endocytose du récepteur Toll de *Drosophila*

Chez la drosophile, il a été montré, récemment, que l'endocytose du récepteur Toll était indispensable à son rôle dans l'embryogénèse et l'immunité innée (Huang et al., 2010; Lund et al., 2010). Dans un premier temps, un crible d'ARN interférents spécifiques de phosphatases en cellules S2 a permis d'identifier Mop comme une protéine nécessaire à la dégradation de Cactus en réponse à une stimulation immunitaire (Huang et al., 2010). La phosphatase putative Mop était déjà connue pour participer à l'endocytose de l'EGFR (Miura et al., 2008). Grâce à des expériences d'immunofluorescence, Huang *et al.* ont observé que Mop colocalise avec la protéine endocytaire Hrs dans les cellules S2. De plus, l'extinction de *mop* inhibe l'activation de la voie Toll *in vivo* et *in vitro* (Huang et al., 2010). Des études d'épistasie suggèrent que Mop agit en amont de Pelle et dMyD88, c'est-à-dire au niveau du récepteur Toll. Les auteurs ont également remarqué que la protéine Hrs était essentielle à la dégradation de la protéine Cactus. De plus, les protéines Mop au domaine phosphatase putatif muté ou sans domaine phosphatase permettent toujours la signalisation de la voie Toll. En conséquence, l'activité phosphatase de Mop n'est pas nécessaire à l'activation de la voie. Ce résultat est conforté par le fait que HD-PTP, l'homologue humain de Mop, ne possède pas d'activité enzymatique (Gingras et al., 2009). Par contre, Hrs, Mop et Toll font partie d'un même complexe. Donc, Mop agirait plutôt comme un adaptateur qui facilite l'interaction de Toll avec les composants endocytaires (Huang et al., 2010). Par ailleurs, l'endocytose de Toll a aussi été décrite *in vivo* dans le développement embryonnaire. En effet, Lund *et al.* ont observé que Toll10b, la forme constitutivement active de Toll, transloque de la membrane aux endosomes précoce (Lund et al., 2010). En outre, l'inhibition de l'endocytose du côté ventral

de l'embryon diminue la signalisation de Toll localement et conduit à une accumulation de Dorsal du côté dorsal, provoquant une inversion de l'axe dorso-ventral. Réciproquement, l'augmentation de l'endocytose latéralement permet la signalisation locale de Toll. L'endocytose de Toll semble donc fortement corrélée à une signalisation active. Finalement, les auteurs proposent que le récepteur Toll transmette le signal depuis les compartiments endocytaires, plutôt que depuis la membrane plasmique. Ainsi, l'endocytose aurait un rôle crucial dans la régulation spatiale de la voie Toll et dans la formation du gradient de concentration de Dorsal dans le noyau.

## 5. Immunité innée et pathologies

Nous avons vu que l'immunité innée est un fabuleux système, qui constitue la première ligne de défense d'un organisme hôte contre des pathogènes. Cependant, cette réponse doit être intimement régulée car une immunité excessive entraîne de nombreuses pathologies, comme les maladies auto-immunes et inflammatoires (Doherty et al., 2011). Par exemple, la maladie de Crohn est une maladie inflammatoire intestinale, causée par une mauvaise régulation de l'immunité innée de l'intestin (Hisamatsu et al., 2008). Cet organe est exposé à de nombreuses bactéries non-pathogéniques (flore intestinale) et, en condition normale, il maintient son homéostasie sans développer d'inflammation. En revanche, chez un patient souffrant de la maladie de Crohn, la réponse anormale de l'immunité innée contre la flore microbienne est probablement responsable de la diminution de l'intégrité de l'épithélium de l'intestin. Par ailleurs, les maladies démyélinisantes du système nerveux central, comme la sclérose en plaques, sont des maladies inflammatoires auto-immunes (Mayo et al., 2012). Ces pathologies sont causées par un emballage des systèmes immunitaires inné et acquis (Hanafy and Sloane, 2011; Weiner, 2008). En particulier, l'immunité innée est responsable de cette maladie en favorisant la différentiation de certaines cellules immunitaires (Th1 et Th17), ce qui conduit à une inflammation aiguë et induit directement la démyélinisation et empêche la remyélinisation (Mayo et al., 2012). La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune causée par des mécanismes immunologiques multiples. La sur-expression locale du TNF $\alpha$  est fortement impliquée dans la dérégulation de la réponse inflammatoire et la destruction des tissus associés à la pathologie (Jia et al., 2013).

Il est donc important de comprendre comment l'immunité innée est régulée et, plus particulièrement, d'identifier les mécanismes adoptés par les cellules immunitaires pour réguler rapidement et efficacement les voies de signalisation NF-κB. Au vu des nombreuses similitudes entre les voies de signalisation immunitaires de la mouche et celles des mammifères, la drosophile apparaît comme un merveilleux modèle pour déchiffrer le fonctionnement de la réponse immunitaire innée et des modes de régulation mis en jeu au niveau moléculaire. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la régulation par ubiquitination de la voie de signalisation IMD de la drosophile et, plus particulièrement, à l'ubiquitination du récepteur immunitaire PGRP-LC qui semble entraîner son endocytose. J'ai également participé à un projet qui a permis d'identifier les USPs régulant négativement les voies IMD et Toll, et de comprendre le rôle de USP2 sur la protéine adaptatrice Imd.

# Résultats

---



## **A. Le récepteur immunitaire PGRP-LC est régulé par ubiquitination et endocytose**

### **1. Démarche scientifique et résumé de l'article**

Préalablement au début de ma thèse, l'équipe Gen&Chem s'intéressait aux déubiquitinases USPs impliquées dans la régulation de la voie immunitaire IMD, chez la drosophile. L'une des stratégies possibles pour comprendre le rôle de ces USPs est d'identifier quels composants de la voie IMD sont ubiquitinés. Dans cette perspective, j'ai dans un premier temps observé que le récepteur transmembranaire PGRP-LC était ubiquitiné (Fig. 2, Viargues *et al.*). Par la suite, j'ai essayé de comprendre le rôle physiologique de cette ubiquitination et d'identifier quelle(s) déubiquitinase(s) étaient impliquées dans le contrôle de l'ubiquitination de PGRP-LC.

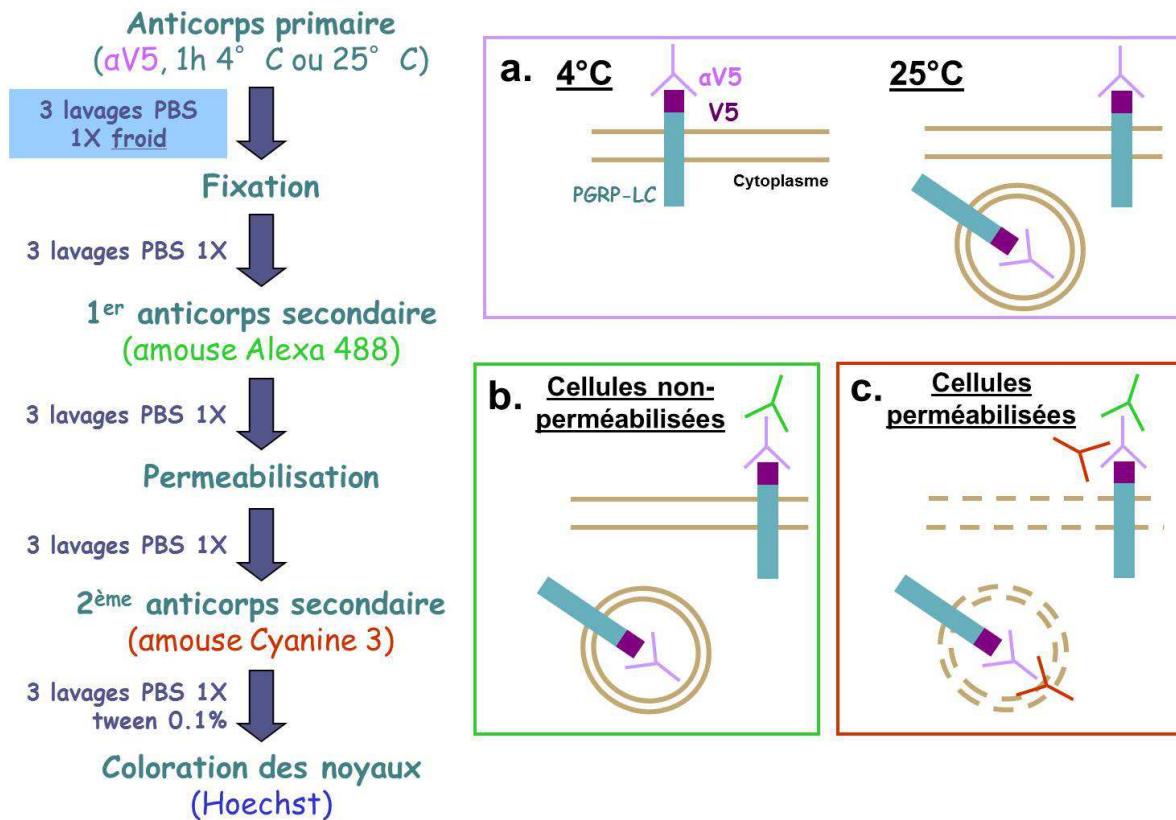
Tout d'abord, j'ai observé que PGRP-LC était constitutivement dégradé (Fig. 1A, Viargues *et al.*). Bien que le protéasome soit l'un des mécanismes principaux de dégradation des protéines ubiquitinées, la stabilité de PGRP-LC n'était pas affectée par l'inhibiteur protéasomal MG132 (Fig. 1C, Viargues *et al.*). Par ailleurs, l'ubiquitination des récepteurs membranaires est décrit comme un signal d'endocytose, qui envoie les récepteurs ubiquitinés vers la voie endosomale pour finir dans les lysosomes, où ils vont être dégradés par des protéases (Raiborg and Stenmark, 2009). Dans le cas de PGRP-LC, j'ai effectivement observé que l'inhibition de l'endocytose précoce par la drogue dynasore entraînait une accumulation de PGRP-LC dans les lysats cellulaires (Fig. 1C, Viargues *et al.*). En outre, l'activation de la voie IMD par l'ajout de PGN favorise la dégradation de PGRP-LC (Fig. 1B, Viargues *et al.*), qui apparaît donc comme un moyen de stopper l'activation de la voie IMD après stimulation.

La déubiquitinase USP8 est connue pour réguler l'endocytose de nombreux récepteurs membranaires (Berlin *et al.*, 2010a; Li *et al.*, 2012; Mizuno *et al.*, 2006) mais son rôle est controversé. Les études les plus récentes suggèrent plutôt que USP8 favorise l'entrée des récepteurs ubiquitinés dans les vésicules intraluminales des MVBs (Ali *et al.*, 2013). J'ai donc testé l'effet de l'inhibition de *Usp8* sur l'ubiquitination du récepteur PGRP-LC, à la fois *in vivo* et *in cellulo*. Ainsi, j'ai observé que l'extinction de *Usp8* provoque une augmentation de l'ubiquitination associée à PGRP-LC (Fig. 2, Viargues *et al.*). En revanche, il n'est pas possible de discriminer si cette augmentation est provoquée par le fait que l'hydrolyse de

l'ubiquitine liée à PGRP-LC ne se fait plus ou bien si elle résulte d'une accumulation de PGRP-LC sous une forme ubiquitinée. Dans cette hypothèse, PGRP-LC ubiquitiné ne pourrait plus être dégradé par le système endocytaire, possiblement bloqué par l'extinction de *Usp8*. Bien que moins importante que celle provoquée par l'extinction de *Usp8*, l'augmentation de l'ubiquitination de PGRP-LC a également été observée en éteignant les gènes codant pour les protéines endocytaires Hrs et Rab5 (Fig. 4, Viargues *et al.*).

L'ensemble de ces résultats convergent vers l'hypothèse que PGRP-LC est endocyté, en vue d'être dégradé. A partir de protocoles déjà publiés, j'ai mis au point un protocole d'immunofluorescence adapté afin de suivre l'internalisation du récepteur PGRP-LC, (Froquet et al., 2012; Moretti et al., 2012) (Annexe 1). Il est basé sur le fait que le tag V5 de la construction PGRP-LC-V5 se situe du côté extracellulaire en C-terminal. Ainsi, l'incubation des cellules S2 de drosophile (non fixées et non perméabilisées), préalablement transfectées par la construction PGRP-LC-V5, avec l'anticorps primaire anti-V5 permet le marquage des récepteurs PGRP-LC initialement à la membrane (Fig. 20a). La température d'incubation oscille entre 4°C (endocytose bloquée) et 25°C (le complexe PGRP-LC-V5/anti-V5 peut internaliser), de façon à obtenir une cinétique d'internalisation de PGRP-LC. Ensuite, les cellules sont fixées et l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 ne reconnaît que les complexes PGRP-LC-V5/anti-V5 encore ancrés à la membrane (Fig. 20b). Enfin, les cellules sont perméabilisées avec du triton et l'ajout de l'anticorps secondaire associé à la Cyanine 3 permet l'observation des complexes PGRP-LC-V5/anti-V5 à la fois à la membrane et ceux internalisés dans le cytoplasme (Fig.20c). Il est important de garder à l'esprit qu'avec ce protocole, une diminution ou une disparition de la quantité de PGRP-LC à la membrane n'a jamais été observée. Cela peut s'expliquer par le fait que l'anticorps primaire peut continuellement reconnaître, en plus du PGRP-LC initialement à la membrane, les nouveaux récepteurs adressés à la membrane pendant l'incubation. Il peut s'agir des PGRP-LC nouvellement synthétisés et/ou recyclés depuis les endosomes précoces. La limite de l'observation par microscopie confocale provient du fait que nous ne disposons pas d'anticorps permettant de reconnaître le PGRP-LC endogène. De ce fait, les cellules S2 sont transfectées par une construction PGRP-LC taguée V5. Malheureusement, le taux de transfection des cellules S2 est faible et l'expression de la construction est très hétérogène d'une cellule tansfектée à l'autre. En conséquence, il est difficile de comparer deux conditions entre elles, à moins que l'effet soit évident. C'est pourquoi, j'ai ensuite adapté ce protocole

pour quantifier les fluorescences par cytométrie (Annexe 2). Cette technique apporte la dimension quantitative qu'il manque à l'observation par la microscopie confocale.



**Figure 20. Principe du protocole d'immunofluorescence permettant de suivre l'internalisation du récepteur membranaire PGRP-LC.** Cette expérience tire parti du fait que le tag V5 de la construction PGRP-LC-V5 se trouve du côté extracellulaire. Avant l'ensemencement des cellules S2, les lamelles de verre doivent être traitées à la poly-lysine, pour que les cellules adhèrent suffisamment. (a) Les cellules S2 transfectées par PGRP-LC-V5 sont incubées avec l'anticorps primaire anti-V5, qui reconnaît les récepteurs PGRP-LC initialement à la membrane. A 4°C, le processus endocytaire est réversiblement bloqué, alors qu'à 25°C, le complexe PGRP-LC-V5/ anti-V5 peut internaliser dans le cytoplasme. (b) Les cellules sont ensuite fixées et un premier anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 ne peut lier que les complexes PGRP-LC-V5/ anti-V5 restés à la membrane. (c) Les cellules sont permeabilisées et le deuxième anticorps secondaire couplé à la Cyanine 3 reconnaît à la fois les complexes PGRP-LC-V5/ anti-V5 à la membrane et ceux ayant internalisés. Pour finir, les noyaux sont colorés par le Hoechst et les préparations sont observées par la microscopie confocale.

Grâce à ce protocole d'immunofluorescence adapté, j'ai prouvé que le récepteur PGRP-LC est internalisé. En effet, les cellules incubées à 4°C pendant une heure (condition T0) ont

un marquage exclusivement membranaire, alors que des points rouges organisés autour du noyau apparaissent lorsque l'endocytose est permise à 25°C pendant 5 à 30 minutes (conditions T5min, T15min et T30 min) (Fig. 5A, Viargues *et al.*). Ces observations sont confirmées par les résultats de cytométrie qui montrent que la fluorescence relative Cyanine 5, associée au deuxième anticorps secondaire qui reconnaît PGRP-LC membranaire et internalisé, augmente avec le temps d'incubation à 25°C (Fig. 5B, Viargues *et al.*). Pour contrer l'hétérogénéité de la transfection, l'analyse a été effectuée sur des cellules exprimant «moyennement» PGRP-LC-V5, c'est-à-dire sur des cellules dont la fluorescence Alexa 488 (celle reflétant seulement PGRP-LC membranaire) est comprise entre  $10^2$  et  $10^3$ . Sur cet échantillon de cellules transfectées, la fluorescence Cyanine 5 moyenne a été normalisée par rapport à la condition T0. Quatre expériences de cinétique ont été effectuées et, sur le diagramme, la moyenne de la valeur relative «fluorescence Cyanine 5 moyenne à Tx normalisée par fluorescence Cyanine 5 moyenne à T0» est représentée pour les différentes conditions (T0, T15min, T30min et T45min).

Le protocole d'immunofluorescence a ensuite été utilisé pour tester l'effet de la stimulation de la voie IMD sur l'internalisation du récepteur PGRP-LC. Ainsi, j'ai remarqué que, rapidement, la distribution de PGRP-LC membranaire n'est plus uniforme quand les cellules sont induites par du PGN. En effet, cette répartition membranaire ressemble à une structure en «collier de perles», qui pourrait refléter l'oligomérisation de PGRP-LC connue pour être nécessaire à la transduction du signal (Fig. 6, Viargues *et al.*) (Choe *et al.*, 2005). De plus, lorsque l'endocytose est permise continuellement pendant une heure (T60min), l'induction par les PGN augmente la quantité de PGRP-LC internalisé.

Finalement, ces résultats nous conduisent à proposer le modèle suivant : l'activation de la voie IMD entraîne l'oligomérisation de PGRP-LC. Ensuite, l'ubiquitination de ces oligomères va déclencher leur internalisation dans le cytoplasme. Par comparaison avec d'autres récepteurs ubiquitinés, comme l'EGFR, nous pouvons spéculer que, au niveau des endosomes précoces, USP8 déubiquitine PGRP-LC et favorise ainsi son entrée dans les MVBs, où il va suivre la voie de dégradation lysosomale. Ainsi, l'endocytose de PGRP-LC apparaît comme un moyen d'éliminer les récepteurs après activation de la voie et contribue probablement à stopper l'activité du récepteur en réponse à l'infection. Ce mécanisme permet aussi d'éviter l'accumulation du récepteur ubiquitiné qui pourrait s'accumuler sous forme d'agrégats protéiques ubiquitinés, dont on sait qu'ils sont très délétères pour les cellules.

**2. Article Viargues *et al.* (en préparation)**

**Title: Regulation of the immune receptor PGRP-LC by ubiquitination and endocytic degradation**

Perrine Viargues <sup>123</sup>, Marie-Odile Fauvarque <sup>123</sup>

**Affiliations**

<sup>1</sup> Université Grenoble-Alpes; 38000 Grenoble, France

<sup>2</sup> CEA; DSV; iRTSV; Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant; Laboratoire de Biologie à Grande Echelle; Grenoble, France

<sup>3</sup>INSERM UMRS-U1038; Grenoble, France

**Contact**

Marie-Odile Fauvarque : email, marie-odile.fauvarque@cea.fr

Phone +334 38 78 26 37, Fax +334 38 78 50 32

## Abstract

The stability and activity of many membrane receptors are regulated by the endocytic trafficking. Ubiquitination of these receptors is described to promote their endocytosis and, in a number of cases, the deubiquitinating enzyme USP8 (or UBPY) regulates their subsequent lysosomal degradation. Here, we describe a new regulatory mechanism of PGRP-LC stability through the endosomal pathway in *Drosophila*. PGRP-LC is an immune receptor activated by the recognition of Gram-negative bacteria PGN and driving the immune deficiency (IMD) pathway. We evidenced that the PGRP-LC degradation is dependent from endocytosis and promoted by the addition of PGN. Then, we showed that PGRP-LC is ubiquitinated and that blocking endocytic process by silencing genes, such as *Rab5* and *Hrs*, provoked an accumulation of ubiquitinated PGRP-LC in S2 cells. Ubiquitination level and endocytosis of PGRP-LC are likely controlled by USP8, since *Usp8* knockdown in either S2 cells or living flies provoked an accumulation of ubiquitinated PGRP-LC. Subsequently, we developed an innovative protocol of immunostaining to see the PGRP-LC internalization. Thereby, we observed that the activation of the IMD pathway by PGN increased the level of cytosolic PGRP-LC. Silencing *Usp8* did not block PGRP-LC internalization but led to the accumulation of ubiquitinated aggregates in the cytosol, which likely results from a blockage of the degradation process of several membrane receptors, including PGRP-LC. Our results identify PGRP-LC endocytosis as a rapid mechanism allowing for internalization and elimination of ubiquitinated PGRP-LC following an immune challenge.

**Key words:** IMD, PGRP-LC, endocytosis, USP8

## Introduction

The innate immune system detects a wide range of pathogens *via* distinct pattern recognition receptors (PRRs), triggering the activation of various defense mechanisms such as phagocytosis and specific immune signaling [1]. The activation of the innate immune system stimulates the adaptive immunity, relying on lymphocytes activation upon antigen presentation and memory of the encountered pathogen. A misregulated immunity may be at the origin of inflammation and severe auto-immune diseases, implying a network of down-regulatory mechanisms [2-5].

In the fruit fly *Drosophila melanogaster*, the main defense mechanism relies on its innate immunity, since an adaptive immune response lacks in invertebrates [6]. Two conserved immune pathways are distinguished in flies and both result in the activation of different NF- $\kappa$ B transcription factors, which specifically regulate immune response genes expression, among which antimicrobial peptide encoding genes. On the one hand, the Toll pathway is activated by the recognition of fungi and Gram-positive bacteria by circulating PRRs, inducing the indirect activation of the Toll receptor and the expression of a set of antimicrobial peptide genes, including *drosomycin* [7]. On the other hand, the IMD (immune deficiency) pathway is induced upon the direct binding of DAP-peptidoglycans (PGN), specific to Gram-negative bacteria and a subset of Gram positive, by the PGRP-LC receptor [8, 9]. Then, PGRP-LC triggers the activation cascade of the IMD pathway, which leads to the expression of another set of antimicrobial genes, including *attacin* and *diptericin*. As in mammals, *Drosophila* immune pathways are regulated to avoid an excessive immune response, which is deleterious to the flies [10-12].

Endocytic trafficking regulates the function of several plasma membrane receptors which mainly internalize from the plasma membrane through clathrin-coated vesicles and are translocated to early endosomes [13]. Then, receptors can be recycled back to the cell membrane either directly or indirectly *via* recycling endosomes, or convey to lysosomes for proteolytic degradation, through sorting to multivesicular bodies (MVB) and late endosomes [14]. The ESCRT (Endosomal Sorting Complex for Transport) machinery ensures several functions during endocytosis. ESCRT complexes recognize ubiquitinated cargoes, preventing their recycling and, therefore, promoting their degradation. They are also instrumental in the deformation of the endosomal membrane and catalyze the final abscission of the endosomal invaginations [15]. Hrs (Hepatocyte growth factor Regulated Substrate), in particular, is a

subunit of the ESCRT-0 complex. Hrs recruits ubiquitinated proteins *via* its two ubiquitin-binding domains (UBD) [16] and promotes their degradation through the MVB pathway. Besides, Rab GTPases serve as crucial regulators of vesicular membrane transport. Notably, Rab5 occurs in early endosomes and takes part in the cargo segregation in endosomal microdomains [17].

Ubiquitination of membrane proteins occurs both at the cell membrane and at early endosomes to regulate their internalization and intracellular sorting [16, 18]. Ubiquitination is a reversible post-translational modification consisting in the linkage of ubiquitin monomers or polymers *via* the free amine group of a lysine (K) in the targeted protein. Depending on their nature, ubiquitin moieties can address proteins for endocytosis, proteasomal degradation or modify their activity. Conjugation of one or several mono-ubiquitin (multi-ubiquitination) was first identified to trigger receptors endocytosis [19]. More recently, K63-linked ubiquitin chains (K63-polyUb) was described as a signal for protein sorting into the MVB pathway [20]: indeed, while mono-ubiquitination of the membrane protein Gap1 triggers its internalization, K63-polyUb directs Gap1 to the MVB pathway [20]. The ESCRT-0 complex has a weak affinity to ubiquitin [21]. Therefore, K63-polyUb chains or the conjugation of numerous mono-ubiquitination may strengthen the ESCRT-0 binding to ubiquitinated proteins. Protein ubiquitination is counteracted by deubiquitinating enzymes (DUBs) which hydrolyze ubiquitin from their substrates. USP8 (synonym of UBPY), in particular, has been implicated in the endocytic down-regulation of numerous receptors, including EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) and others [22]. However, the effect of USP8 on EGFR trafficking is controversial. In some studies, USP8 was shown to prevent EGFR degradation [23, 24] whereas others studies reported that USP8 increases EGFR down-regulation [25-27].

In this study, we showed that endocytic pathway promotes both the internalization and the degradation of the PGRP-LC receptor. PGRP-LC internalization and degradation are notably stimulated by the addition of PGN, probably allowing for the elimination of activated PGRP-LC. Ubiquitination of PGRP-LC was evidenced both *in cellulo* and *in vivo*, which may provide the signal for endocytosis and degradation. Silencing *Usp8* or endocytic genes *Rab5* and *Hrs* led to a strong accumulation of ubiquitinated PGRP-LC, indicating that USP8 and other actors of the endocytic machinery are required for the degradation of ubiquitinated PGRP-LC. Moreover, silencing of *Usp8* did not significantly interfere with the IMD signaling, suggesting that USP8 acts at the level of inactivated ubiquitinated PGRP-LC, after the immune signal has been achieved. Subsequently, we visualized the PGRP-LC

internalization in S2 cells and showed that PGN addition promotes the immediate PGRP-LC oligomerization at the cell surface which is then followed by an enhanced internalization rate. Taken together, our results show that PGRP-LC ubiquitination and subsequent endocytosis is regulated by USP8 and provides a newly described mechanism for the rapid turnover of PGRP-LC following immune challenge.

## Results

### Immune stimulation favors PGRP-LC degradation

To assess PGRP-LC receptor turnover, *Drosophila* S2 cells were transfected with V5 tagged construct and the level of PGRP-LC-V5 in cell lysates was determined by western blot analysis. When S2 cells were treated by the protein synthesis inhibitor cycloheximide, the amount of PGRP-LC in lysate decreased compare to untreated cell lysate (Fig. 1A). This suggests that PGRP-LC is subjected to a permanent turnover. The amount of PGRP-LC was then followed at different time after addition of peptidoglycan (PGN) (Fig. 1B). In cycloheximide treated cell lysates, the PGRP-LC level progressively decreased after PGN treatment, while PGRP-LC amount stayed unchanged in non-treated cells. This result indicates that the activation of the IMD pathway stimulates the degradation of PGRP-LC and that new receptors are synthetized *de novo* following immune stimulation.

### Endocytic but not proteasome activity is required for PGRP-LC degradation

Proteasome activity is one of the main cell mechanisms allowing for protein degradation. Therefore, we treated PGRP-LC-V5 transfected S2 by MG132, a proteasomal inhibitor (Fig. 1C). We observed that the MG132 treatment did not lead to the stabilization of PGRP-LC. Hence, PGRP-LC degradation is mostly independent from proteasome. Some receptors, such as EGFR and Notch, are known to be rather degraded by lysosomal proteases following their internalization [28, 29]. To investigate if PGRP-LC is degraded by endocytosis, transfected S2 cells were treated by dynasore, a dynamin inhibitor. The dynamin GTPase is principally involved in the scission of newly formed vesicles [30]. Therefore, dynasore treatment inhibits endocytosis at early stage, namely during membrane proteins migration *via* the future endocytic vesicle. The dynasore treatment significantly increased the amount of PGRP-LC in cell lysate (Fig. 1C). Interestingly, dynasore treatment also favored the outbreak of high molecular weight bands that could match to PGRP-LC multimeric complexes (Supp. Fig. 1).

**PGRP-LC is an ubiquitinated receptor controlled by the deubiquitinating enzyme USP8**

Ubiquitination of a number of plasma membrane proteins is a known tag for their endocytosis [18, 20, 31, 32]. However, PGRL-LC ubiquitination status has not been described yet. To answer this question, immunoprecipitated PGRP-LC-V5 was revealed by anti-ubiquitin antibodies, resulting in a smear, characteristic of ubiquitination, for cells transfected by PGP-LC-V5 compared to control cells (Fig. 2A). Thereby, we pointed out that the PGRP-LC receptor is ubiquitinated. At early endosomes, the deubiquitinating enzyme USP8 (or UBPY) regulates the MVB sorting of numerous ubiquitinated membrane receptors [18, 23, 33]. So, we tested the effect of silencing *Usp8* on the PGRP-LC ubiquitination level. We obtained a strong increase of ubiquitinated PGRP-LC forms in *Usp8* silenced cells compare to cells incubated with control double strand RNA (dsRNA) (Fig. 2A). Similar experiments were performed with extracts from flies expressing a GFP tagged PGRP-LC (Fig. 2B). On the one hand, we observed that the receptor was ubiquitinated *in vivo*. On the other hand, we confirmed that the silencing of *Usp8* in flies led to a strong accumulation of ubiquitinated PGRP-LC forms. Consequently, we conclude that USP8 directly deubiquitinates PGRP-LC and/or that it promotes ubiquitinated PGRP-LC to be degraded by the endosome-lysosomal machinery.

In order to evaluate if accumulated ubiquitinated PGRP-LC is able to induce immune signaling, the IMD pathway activation was monitored in *Usp8* depleted cells following immune stimulation. Activation of the IMD pathway was achieved by adding heat-killed *E. coli* in the culture medium and was monitored using the *Attacin-luciferase* (*AttA-luc*) reporter gene [34]. Interestingly, silencing *Usp8* did not modify the induction of the *AttA-luc* reporter gene in *E. coli* stimulated cells, compared to cells treated with control dsRNA (Fig. 3). This result suggests that *Usp8* silencing leads to an accumulation of inactivated PGRP-LC form.

**Blocking endocytosis leads to the accumulation of ubiquitinated PGRP-LC**

To further assess if the destiny of ubiquitinated PGRP-LC is controlled by endocytosis, we tested the effect of blocking the endocytosis on the amount of ubiquitinated PGRP-LC forms. To this aim, S2 cells were transfected with PGRP-LC-V5 and incubated or not with dsRNAs specific to either *Rab5* or *Hrs*. PGRP-LC was immunoprecipitated from cell lysates and samples were immunoblotted with anti-ubiquitin antibodies. Indeed, we noted that silencing either *Rab5* or *Hrs* increased the amount of ubiquitinated PGRP-LC (Fig. 4A, B). These

results put together argue that endocytosis controls the degradation of ubiquitinated PGRP-LC.

### **PGRP-LC is endocytosed in S2 cells**

All the previous results imply that PGRP-LC would be internalized through the endocytic machinery, then promoting its degradation. So, inspired by published experiments [35, 36], we developed a protocol to highlight and follow the PGRP-LC receptor internalization in S2 cells transfected with a PGRP-LC-V5 construct (see methods). Briefly, non-permeabilized living cells were incubated at 4°C to block endocytosis and incubated with primary antibodies (anti-V5), recognizing PGRP-LC-V5 at the cell surface. Internalization of the primary antibody/ PGRP-LC-V5 complex was then allowed for 5 to 60 minutes at 25°C, while control cells were maintained at 4°C. Cells were fixed but no permeabilized before addition of the secondary antibody coupled to Alexa 488 fluorescent dye, which only binds to the primary antibody/ PGRP-LC-V5 complex at the membrane external face. Cell membranes were then permeabilized and another secondary antibody linked to Cyanine 3 was used to detect both membrane and cytosolic primary antibody in complex with PGRP-LC-V5.

This protocol allowed for the distinction of membrane (in green) PGRP-LC to both membrane and internalized receptor (in red) by confocal microscopy (Fig. 5A). At T0, PGRP-LC was as expected mainly, if not exclusively, localized at the cell membrane, while cells incubated at 25°C for 5 to 30 minutes at 25°C displayed both membrane and internalized PGRP-LC (Fig. 5A). The cytosolic receptor was united in organized structure, which seemed to migrate nearby nucleus over time. This observation underlies that PGRP-LC is internalized.

In order to quantify the amount of internalized PGRP-LC, we also performed a cytometry assay based on a similar protocol (see methods). Results of four independent experiments were averaged and showed an increase of Cyanine 5 signal in function of the time incubation at 25°C (Fig. 5B). This reflects the fact that longer cells were incubated at 25°C, the more PGRP-LC was in the cytoplasm.

### Immune stimulation triggers PGRP-LC internalization

In order to observe PGRP-LC endocytosis in response to immune stimulation, we used the same immunostaining protocol in the presence of PGN during the primary antibodies incubation. PGN stimulation significantly modified the repartition of PGRP-LC at the cell membrane which, rather to be uniformly distributed, looked like to a “pearl necklace” distribution, in the five minutes following PGN addition. It most probably reflects immediate oligomerization of activated receptors (Fig. 6, left figure). Moreover, one hour of PGN stimulation at 25°C (T60min) induced a significant increase of cytoplasmic PGRP-LC compared to uninduced cells (Fig. 6, right figure). Hence, the IMD pathway activation by addition of PGN provokes a rapid redistribution of PGRP-LC at the cell membrane and enhances its internalization rate.

### Discussion

Our work identifies a regulatory mechanism of the PGRP-LC immune receptor stability in *Drosophila*. First, we showed that PGRP-LC is subjected to a permanent turnover and that its degradation is enhanced by immune stimulation. Second, we demonstrated that PGRP-LC degradation occurs independently from the proteasome but *via* the endocytic pathway. Moreover, we pointed out that PGRP-LC is ubiquitinated and that ubiquitinated PGRP-LC level is controlled by the endocytic proteins Hrs and Rab5, as well as the deubiquitinating enzyme USP8, already described to regulate internalization and stability of numerous membrane receptors [24, 27]. Finally, we developed an adapted immunostaining protocol and evidenced the PGRP-LC dynamic distribution at the cell membrane and trafficking toward the cytoplasm in response to immune stimulation.

Ubiquitination has been well-documented to occur at different endocytic steps. The nature of ubiquitin moieties involved in this mechanism is diverse, including mono-, multi- or various kind of poly-ubiquitination [19, 20, 37]. Here, we showed for the first time that PGRP-LC is ubiquitinated both *in cellulo* and *in vivo*. Then, we observed that blocking the MVB pathway by silencing either *Usp8* or endocytic genes increased the amount of ubiquitinated PGRP-LC. Accumulation of ubiquitinated PGRP-LC was particularly high in *Usp8* silenced cells compared to *Hrs* or *Rab5* depleted cells. This result suggests that USP8 hydrolyzes ubiquitin moieties linked to PGRP-LC. In addition, USP8 may also play a crucial function in the

endocytic process of ubiquitinated substrate. This last hypothesis is supported by the fact that USP8 has been involved in endocytosis of an increasing number of receptors [18, 22, 26, 38, 39]. Furthermore, *Usp8* deficient cells exhibit aberrantly enlarged multivesicular endosomes colocalizing with enhanced ubiquitination [22, 25] (Supp. Fig. 2). Consequently, we suggest that the *Usp8* depletion disrupts the proceeding of endocytosis, leading to the accumulation of ubiquitinated PGRP-LC in endosomes which cannot be sorted and degraded by the lysosomal pathway. According to this hypothesis, PGRP-LC ubiquitinated forms are specifically targeted to the endosomal pathway.

In our study, we showed that the activation of the IMD pathway by PGN triggered both the PGRP-LC internalization, as observed by immunofluorescence, and its degradation, as observed on western blots experiments. The PGRP-LC degradation suggests that endocytosis down-regulates the IMD pathway signaling. Thereby, we further investigated the USP8 contribution to the regulation of the IMD signaling and we noted that blocking endocytosis by silencing *Usp8* did not significantly interfere with the IMD signaling, after induction by *E. coli* in S2 cells. This result implies that *Usp8* depletion leads to an accumulation of PGRP-LC inactive ubiquitinated forms. Another hypothesis is that the *Usp8* knockdown confines PGRP-LC into the intraluminal vesicles of MVBs and, consequently, the receptor is not able to transmit the signal anymore. This last suggestion is consistent with the fact that USP8 acts on the ESCRT-III level to deubiquitinate EGFR, allowing for its integration in intraluminal vesicles and its subsequent lysosomal degradation [27].

On the other hand, although receptors endocytosis was first described as a degradation mechanism to down-regulate the signaling pathway, it is currently obvious that, in some cases, receptors internalization also takes part in the signaling process. For instance, the TNF-R1 internalization allows for the selectivity of the signaling pathway induced by this receptor. Indeed, whereas TNF-R1 induces a pro-inflammatory response from the plasma membrane, this receptor also activates a pro-apoptotic signaling pathway from endosomes [40]. Moreover, it was observed that knockdown *Hrs* by RNAi prevents the Toll signal-dependent degradation of Cactus in *Drosophila* [41]. *Hrs* is present in a complex with the Toll immune receptor and promotes Toll-dependent signaling, indicating that endocytosis is needed for the *Drosophila* Toll immune signaling. The Toll endocytosis was also confirmed to be necessary for its role in *Drosophila* embryogenesis [42]. Unfortunately, our results did not allow us to discriminate if PGRP-LC internalization takes part in the IMD signaling but rather

demonstrate its crucial role in PGRP-LC turnover, thus avoiding accumulation of inactivated protein aggregates.

Besides, we observed by immunofluorescence staining that PGN immune stimulation led to an immediate redistribution of PGRP-LC receptor at the cell surface towards a “necklace” organization at very early stage of endocytosis (T0 and T5min). We propose that these spots reflects the PGRP-LC oligomerization, which is described to occur following ligand recognition [43] and which promotes rapid signal transduction trough the Imd scaffolding complex. Similarly, the high molecular weight bands observed in dynasore treated cell lysates by western blots could match to PGRP-LC multimers suggesting that activated multimeric complexes, which are stabilized in dynasore treated cells, are the forms addressed to the endocytic process. This hypothesis implies that PGRP-LC oligomers are very stable because western blot was carried out under denaturing conditions.

According to our results, we suggest that PGN induces the PGRP-LC oligomerization, allowing for the IMD pathway activation. Then, the ubiquitination of active PGRP-LC oligomers triggers their endocytosis, inactivation and degradation, possibly contributing to avoid sustained IMD signaling. In conclusion, we highlighted a new mechanism for the control of PGRP-LC homeostasis. We show for the first time that PGRP-LC receptor is ubiquitinated and endocytosed to be degraded. In this process, the deubiquitinating enzyme USP8 promotes the PGRP-LC MVB sorting, most probably by deubiquitinating PGRP-LC and enhancing its integration in intraluminal vesicles of MVBs. How PGRP-LC is ubiquitinated in response to infection remains undetermined and it would be interesting to identify both the E3 ligase mediating this effect and a DUB counteracting the PGRP-LC degradation in favor of recycling. In addition, this study does not exclude that early step of PGRP-LC internalization could be necessary for the IMD signaling pathway, before its inactivation and entry into the lysosomal pathway, ensuring its final degradation.

## Experimental procedures

### Fly strains

Flies were raised on standard culture medium at 18 or 20°C. Transgenic lines were constructed in the P{UASt} vector [44]. The line P{UAS-*Usp8*-IR} was obtained from Vienna Drosophila Research Center (VDRC #8931) [45]. P{UAS-PGRP-LCx 77A EGFP} expressing the PGRP-LCx cDNA CG4432-RA fused to EGFP under the control of UAS regulatory sequences was obtained from Dr. Tang [46]. Ubiquitous driver transgene daughterlessGal4 (daGal4) was obtained from the Bloomington stock center and was recombined with the temperature sensitive inhibitor Gal80ts transgene [47]. Temperature driven expression of transgenes was achieved by crossing flies with daGal4, Gal80ts driver line. Progeny were maintained at 20°C during the development and switched at 30°C during 2 days at adult stage to allow the transgene expression before freezing.

### Cell culture and RNA silencing

*Drosophila* S2 cells were maintained in Schneider's *Drosophila* medium supplemented with 10% heat inactivated fetal cow serum (Invitrogen). DNA templates for dsRNA synthesis were generated by PCR using the primers specific to each target genes. Primers were designed from *Drosophila* RNAi screening center databases (<http://www.flyrnai.org>; DRSC15876 for *siUsp8*, DRSC23710 for *siRab5* and DRSC27741 for *siHrs*) [45]. Purified PCR products were used as DNA templates for *in vitro* transcription of RNAi using the MEGAscript RNAi kit (Ambion). Gene silencing was achieved by the addition of 50 µg of dsRNA simultaneously to the DNA transfection (see below).

### Monitoring IMD pathway activation in S2 cells

To measure IMD pathway activation, we used the reporter constructs pAtta-luc [43, 48]. The Dual-luciferase reporter assay (Promega) was used by normalizing with *pAc-luc* (Engel *et al.*, in prep). Simultaneously with dsRNAs, DNA transfection was performed with 10 ng of *pAc-luc* normalisator and 10 pg of *pAtta-luc*, 48 hours prior luciferase detection. To activate the IMD pathway, heat-killed *E. coli* ( $2.10^8$  bacterial cells per well) were added 6 hours prior dual detection of the two luciferases. Each condition was done in triplicates.

### Immunoprecipitation and immunoblotting from cell extracts

To observe PGRP-LC protein expression, S2 cells ( $20.10^6$  cells) were transfected with 1  $\mu$ g of pMT PGRP-LC-V5 or 1  $\mu$ g of empty vector pMT according to standard procedures. The pMT PGRP-LC-V5 construct was obtained from Dr. Anderson [43] and allows for the expression of the full-length isoform x of PGRP-LC under metallothionein promoter. The expression of PGRP-LC-V5 is activated by the addition of CuSO<sub>4</sub> 500  $\mu$ M 24 hours after transfection.

Gene silencing was achieved by the addition of 50  $\mu$ g of dsRNA simultaneously to the DNA transfection. S2 cells were lysed 48 hours after transfection. To test the stability of PGRP-LC, cells were treated by MG132 20  $\mu$ M (proteasome inhibitor, Sigma-Aldrich) or cycloheximide 8mg/ml (protein synthesis inhibitor, Sigma-Aldrich) for 4 hours before lysis. To block early endocytic step, cells were treated by dynasore 80  $\mu$ M (dynamin inhibitor, Tebubio) for 1 hour before lysis [49]. To activate the IMD pathway, peptidoglycan (PGN, Invivogen) at 80 ng/ml was added for 5 to 30 minutes in S2 cell culture media. The used lysis buffer was {NaCl 150 mM; Triton 0,6%; EDTA 4 mM; EGTA 4 mM; protease inhibitor cocktail 0,5% (Sigma – ref. P8340); PR619 35  $\mu$ M (déubiquitinase inhibitor from Tebubio)}. In order to reveal its ubiquitinated forms, PGRP-LC-V5 was immunoprecipitated by anti-V5 antibodies (Life Technologies) following standard procedures and revealed with anti-ubiquitin antibodies (FK2, Enzo Life Sciences). FK2 antibodies recognize both mono- and poly-ubiquitinated proteins but not free ubiquitin. Western Blots with whole cell lysates were revealed with anti-V5 to detect PGRP-LC-V5 and anti- $\beta$ -Tubulin (internal loading control).

### Immunoprecipitation and immunoblotting from fly extracts

Progeny was maintained at room temperature and incubated 2 days at 30°C to inhibit Gal80ts expression and allow Gal4 expression (and subsequently transgenes expression). About fifteen flies per genotype were lysed according to standard protocol and PGRP-LC-GFP was immunoprecipitated by anti-GFP antibodies (Cell Signaling). Ubiquitinated forms of the receptor were revealed by anti-ubiquitin antibodies and the level of immunoprecipitated PGRP-LC was observed with anti-GFP antibodies. Whole fly extracts were immunoblotted with anti-GFP to detect PGRP-LC-GFP and anti- $\beta$ -Tubulin (internal loading control).

### Immunofluorescence

The protocol of immunofluorescence was inspired from studies about membrane proteins trafficking [35, 36]. It is based on the fact that the V5 tag of PGRP-LC-V5 construct is on C-terminal side, localized in the extracellular space. At least 24 hours before immunostaining, S2 cells ( $5.10^5$  cells per well) were transfected with 50 ng per well of pAc PGRP-LC-V5 and in silencing experiments, with 2  $\mu$ g per well of dsRNA. Alive cells were incubated with anti-V5 mouse antibodies for one hour in all. It recognized PGRP-LC-V5 initially at the membrane, since cells were not permeabilized yet. S2 cells were incubated with anti-V5 (Life Technologies) at 4°C (blocked endocytosis: T0) and different duration at 25°C (permitted endocytosis: T5min, T15min, T30min), to get a kinetic of the PGRP-LC internalization. In some experiments, PGN 80 ng/ml was added to the primary antibody to activate the IMD pathway. Then, on unpermeabilized but fixed cells, a first secondary antibody (anti-mouse Alexa 488, Life Technologies) was used to detect anti-V5 linked to PGRP-LC-V5 still at the membrane. After permeabilization, another secondary antibody (anti-mouse Cyanine 3, Life Technologies) was added to highlighted anti-V5 associated to both membrane and cytosolic PGRP-LC-V5. Finally, nuclei were stained by Hoechst. Samples observation was done by confocal microscopy (Leica).

### Cytometry

With the aim to quantify the internalization of PGR-LC, the previous immunofluorescence protocol was adapted to cytometry experiment. For cytometry, anti-mouse Alexa 488 was used to identify membrane PGRP-LC and anti-mouse Cyanine 5 (Life Technologies) labeled membrane and internalized PGRP-LC. The fluorescence reading was performed with Becton Dickinson FACS Calibur. Statistical analysis was done on transfected cells which moderately expressed PGRP-LC (Alexa 488 fluorescence included between  $10^2$  and  $10^3$ ). The Cyanine 5 fluorescence mean of these selected cells was compared in function of the time of cells incubation at 25°C. For each point, Cyanine 5 fluorescence mean was normalized by the Cyanine 5 fluorescence mean of T0. This experiment was independently carried out four times and we averaged the relative Cyanine 5 fluorescence for each condition.

## Acknowledgement

We thank Didier Grunwald for his expert assessment in confocal microscopy; Véronique Collin-Faure for her precious ideas and help for cytometry; all members of the lab for powerful discussion, specially Dominique Thevenon and Jackie Perrin for constructs building and Magda Mortier for her help in S2 cells luciferase assays; A.H. Tang and the DGRC, VDRC and Bloomington stock centers for sending flies; K.V. Anderson for sending vector constructs; Claire Bama ad Christine Magnin for technical help in flies food preparation and laboratory maintenance. This work was supported by Region Rhône-Alpes (MOF) and ARC (MOF) and trough a doctoral grant from CEA Irtelis program (PV).

## References

1. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. Science, 2002. **296**(5566): p. 298-300.
2. Doherty, T.A., S.D. Brydges, and H.M. Hoffman, *Autoinflammation: translating mechanism to therapy*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(1): p. 37-47.
3. Hisamatsu, T., H. Ogata, and T. Hibi, *Innate immunity in inflammatory bowel disease: state of the art*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(4): p. 448-54.
4. Mayo, L., F.J. Quintana, and H.L. Weiner, *The innate immune system in demyelinating disease*. Immunol Rev, 2012. **248**(1): p. 170-87.
5. Pamer, E.G., *Immune responses to commensal and environmental microbes*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1173-8.
6. Imler, J.L., *Overview of Drosophila immunity: a historical perspective*. Dev Comp Immunol, 2013.
7. Valanne, S., J.H. Wang, and M. Ramet, *The Drosophila Toll signaling pathway*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 649-56.
8. Leulier, F., et al., *The Drosophila immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 478-84.
9. Gottar, M., et al., *The Drosophila immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein*. Nature, 2002. **416**(6881): p. 640-4.
10. Thevenon, D., et al., *The Drosophila ubiquitin-specific protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signaling*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(4): p. 309-20.
11. Maillet, F., et al., *The Drosophila peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(5): p. 293-303.
12. Zaidman-Remy, A., et al., *The Drosophila amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection*. Immunity, 2006. **24**(4): p. 463-73.
13. Sorkin, A. and M. Von Zastrow, *Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 600-14.
14. Clague, M.J., H. Liu, and S. Urbe, *Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation*. Dev Cell, 2012. **23**(3): p. 457-67.
15. Raiborg, C. and H. Stenmark, *The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 445-52.

16. Mayers, J.R., et al., *ESCRT-0 assembles as a heterotetrameric complex on membranes and binds multiple ubiquitinated cargoes simultaneously*. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 9636-45.
17. Stein, M.P., J. Dong, and A. Wandinger-Ness, *Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(11): p. 1421-37.
18. Li, S., et al., *Hedgehog-regulated ubiquitination controls smoothed trafficking and cell surface expression in Drosophila*. PLoS Biol, 2012. **10**(1): p. e1001239.
19. Mosesson, Y., et al., *Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21323-6.
20. Lauwers, E., C. Jacob, and B. Andre, *K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway*. J Cell Biol, 2009. **185**(3): p. 493-502.
21. Fisher, R.D., et al., *Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 28976-84.
22. Niendorf, S., et al., *Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(13): p. 5029-39.
23. Mizuno, E., et al., *Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(11): p. 5163-74.
24. Berlin, I., H. Schwartz, and P.D. Nash, *Regulation of epidermal growth factor receptor ubiquitination and trafficking by the USP8.STAM complex*. J Biol Chem, 2010. **285**(45): p. 34909-21.
25. Mizuno, E., et al., *A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes*. Traffic, 2006. **7**(8): p. 1017-31.
26. Alwan, H.A. and J.E. van Leeuwen, *UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation*. J Biol Chem, 2007. **282**(3): p. 1658-69.
27. Ali, N., et al., *Recruitment of UBPY and ESCRT exchange drive HD-PTP-dependent sorting of EGFR to the MVB*. Curr Biol, 2013. **23**(6): p. 453-61.
28. Brou, C., *Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands*. Exp Cell Res, 2009. **315**(9): p. 1549-55.
29. d'Azzo, A., A. Bongiovanni, and T. Nastasi, *E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation*. Traffic, 2005. **6**(6): p. 429-41.
30. Henley, J.R., H. Cao, and M.A. McNiven, *Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles*. FASEB J, 1999. **13 Suppl 2**: p. S243-7.
31. Carthew, R.W. and C. Xu. *Endocytosis: why not wait to deubiquitinate?* Current Biology 2000 Jul 13 [cited 10 14]; 2000/07/19:[R532-4].
32. Wojcikiewicz, R.J., *Regulated ubiquitination of proteins in GPCR-initiated signaling pathways*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(1): p. 35-41.
33. Urbe, S., et al., *Control of growth factor receptor dynamics by reversible ubiquitination*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 754-6.
34. Tauszig, S., et al., *Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10520-5.
35. Froquet, R., et al., *TM9/Phg1 and SadA proteins control surface expression and stability of SibA adhesion molecules in Dictyostelium*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(4): p. 679-86.
36. Moretti, J., et al., *The ubiquitin-specific protease 12 (USP12) is a negative regulator of notch signaling acting on notch receptor trafficking toward degradation*. J Biol Chem, 2012. **287**(35): p. 29429-41.

37. Chastagner, P., A. Israel, and C. Brou, *AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2735.
38. Berlin, I., et al., *The deubiquitinating enzyme USP8 promotes trafficking and degradation of the chemokine receptor 4 at the sorting endosome*. J Biol Chem, 2010. **285**(48): p. 37895-908.
39. Mukai, A., et al., *Balanced ubiquitylation and deubiquitylation of Frizzled regulate cellular responsiveness to Wg/Wnt*. EMBO J, 2010. **29**(13): p. 2114-25.
40. Tchikov, V., et al., *Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(6-7): p. 467-75.
41. Huang, H.R., et al., *Endocytic pathway is required for Drosophila Toll innate immune signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(18): p. 8322-7.
42. Lund, V.K., Y. DeLotto, and R. DeLotto, *Endocytosis is required for Toll signaling and shaping of the Dorsal/NF-kappaB morphogen gradient during Drosophila embryogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(42): p. 18028-33.
43. Choe, K.M., H. Lee, and K.V. Anderson, *Drosophila peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 1122-6.
44. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, 1993. **118**(2): p. 401-15.
45. Flockhart, I., et al., *FlyRNAi: the Drosophila RNAi screening center database*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D489-94.
46. Schmidt, R.L., et al., *Infection-induced proteolysis of PGRP-LC controls the IMD activation and melanization cascades in Drosophila*. FASEB J, 2008. **22**(3): p. 918-29.
47. McGuire, S.E., et al., *Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1765-8.
48. Tauszig-Delamasure, S., et al., *Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections*. Nat Immunol, 2002. **3**(1): p. 91-7.
49. Ganeff, C., et al., *Induction of the alternative NF-kappaB pathway by lymphotoxin alphabeta (LTalphabeta) relies on internalization of LTbeta receptor*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(21): p. 4319-34.

**Figure legends****Figure 1. PGRP-LC degradation depends on endocytosis and is promoted by the IMD pathway stimulation**

Drosophila S2 cells were transfected with the expression construct PGRP-LC-V5. **(A)** After 48h, cells were treated or not by cycloheximide 8 mg/ml (an inhibitor of protein synthesis) for 4 hours. PGRP-LC-V5 level in the inputs was monitored by immunoblotting with anti-V5 antibodies (Lysates  $\alpha$ V5). Anti- $\beta$ -tubulin antibodies served as internal loading control (Lysates  $\alpha$  $\beta$ -tubulin). The PGRP-LC level in cell lysates decreased by the treatment of cycloheximide. **(B)** S2 cells were treated or not by cycloheximide 8 mg/ml for 4 hours. Cells were lysed at different time (5, 10 or 30 minutes) after addition of PGN 80 ng/ml or not. Lysates are revealed by anti-V5 and anti- $\beta$ -tubulin. The IMD activation by addition of PGN led to a gradual decrease of PGRP-LC in cell lysates (only observable in cycloheximide-treated cells). **(C)** S2 cells were treated or not by MG132 20  $\mu$ M (a proteasomal inhibitor) for 4 hours or by dynasore 80  $\mu$ M (a dynamin inhibitor) for 1 hour. Lysates were revealed by anti-V5 and anti- $\beta$ -tubulin. PGRP-LC-V5 level was stable in the presence of MG132, while the dynasore treatment led to an accumulation of PGRP-LC.

**Figure 2. Silencing of *Usp8* leads to an accumulation of ubiquitinated PGRP-LC**

**(A)** S2 cells were transfected with the PGRP-LC-V5 expression construct or the empty vector. The dsRNAs specific to *Usp8* (*siUsp8*) or a control gene (*siCtrl*) were also added. S2 cells were lysed 48 hours after transfection. Lysates were precleared and subjected to immunoprecipitation with anti-V5 antibodies and ubiquitinated PGRP-LC was revealed with anti-ubiquitin antibodies (IP $\alpha$ V5  $\alpha$ Ub). Presence of PGRP-LC V5 recombinant proteins in the inputs was assessed by immunoblotting with anti-V5 antibodies (Lysates  $\alpha$ V5). Anti- $\beta$ -tubulin antibodies served as internal loading control (Lysates  $\alpha$  $\beta$ -Tubulin). Ubiquitinated PGRP-LC-V5 was highlighted by a smear between 70 and 150 kDa. The silencing of *Usp8*, but not the *siCtrl*, led to a strong accumulation of its ubiquitinated forms in S2 cells. **(B)** Flies spent 2 days at 30°C before proteins extraction. Protein extracts were prepared from control flies (DaGal4, Gal80ts/+), flies expressing only PGRP-LC-GFP (DaGal4, Gal80ts>PGRP-LC-GFP) or flies expressing both PGRP-LC-GFP and Usp8 IR (DaGal4, Gal80ts>PGRP-LC-GFP + Usp8 IR). PGRP-LC-GFP was immunoprecipitated from fly extracts with anti-GFP antibodies and analyzed with anti-ubiquitin antibodies (IP $\alpha$ GFP  $\alpha$ Ub) or anti-GFP (IP $\alpha$ GFP  $\alpha$ GFP). Fly extracts were revealed with anti-GFP (Lysates  $\alpha$ GFP). In presence of the PGRP-

LC-GFP, IP $\alpha$ GFP  $\alpha$ Ub revealed a smear between 100 and 250 kDa, corresponding to PGRP-LC-GFP ubiquitinated forms. The intensity of this smear was stronger in presence of Usp8 IR transgene.

### Figure 3. Silencing *Usp8* does not interfere with the IMD pathway signaling

S2 cells were co-transfected with *pAttA-luc* reporter gene and *pAc-luc* normalisator to measure the activation of the IMD pathway by heat-killed *E. coli*. Sequence specific long dsRNAs were added into the media to silence indicated target genes in triplicates. Histograms represent the relative *attacin* expression compared to non-infected cells (NI). Cells treated by *siUsp8* did not present a misregulated *attacin* expression after addition of *E. coli* compare to the control (*siCtrl*).

### Figure 4. Inhibition of endocytosis by dsRNAs leads to an accumulation of ubiquitinated PGRP-LC

S2 cells were transfected with the expression construct PGRP-LC-V5 or the empty vector. The dsRNAs specific to a control gene (*siCtrl*), *Rab5* (A) and *Hrs* (B). were also added. S2 cells were lysed 48 hours after transfection. Lysates were precleared and subjected to immunoprecipitation with anti-V5 antibodies and ubiquitinated PGRP-LC was revealed with anti-ubiquitin antibodies (IP $\alpha$ V5  $\alpha$ Ub). Presence of PGRP-LC-V5 recombinant proteins in the inputs was assessed by immunoblotting with anti-V5 antibodies (Lysates  $\alpha$ V5). Anti- $\beta$ -tubulin antibodies serve as internal loading control (Lysates  $\alpha$   $\beta$ -Tubulin). (A) *siRab5* increased the amount of ubiquitin signal associated to PGRP-LC compared to the presence of *siCtrl*. (B) *siHrs* caused also an accumulation of ubiquitin signal when PGRP-LC was immunoprecipitated, in comparison with *siCtrl*.

### Figure 5. PGRP-LC is internalized in S2 cells

S2 cells were transfected with the expression construct PGRP-LC-V5 24 hours before immunostaining. (A) Living cells are labeled with the anti-V5 mouse antibodies during one hour, which recognized initial membrane PGRP-LC. Meanwhile, the cells were incubated at 4°C to block PGRP-LC endocytosis (T0) and more or less time at 25°C (5 minutes for T5min, 15 minutes for T15min and 30 minutes for T30min) to allow the receptor internalization. After fixation, unpermeabilized cells were incubated with a secondary anti-mouse Alexa 488 (shown in green) which only recognized the anti-V5-PGRP-LC-V5 complex at the membrane. After permeabilization of cells membrane, they were incubated with a secondary anti-mouse

Cyanine 3 (shown in red) which detected the anti-V5-PGRP-LC-V5 both at the membrane and in the cytoplasm. Nuclei were stained by Hoechst (shown in blue). At T0, PGRP-LC was essentially at the cell membrane. Then, the more cells stayed at 25°C, the more observed is the red labeling in the cytoplasm. Hence, PGRP-LC is internalized in S2 cells at 25°C, but not at 4°C. Scale: 5  $\mu$ m (B) The previous immunostaining was carried out, except that the secondary antibody used after permeabilization was coupled to Cyanine 5. The point T45 was also added to the kinetic of the PGRP-LC internalization. Both Alexa 488 and Cyanine 5 fluorescences were read and statistical analysis was performed on transfected cells which moderately expressed PGRP-LC (Alexa 488 fluorescence included between 10<sup>2</sup> and 10<sup>3</sup>). For each condition, the mean of Cyanine 5 fluorescence of this population was represented relatively to the mean of Cyanine 5 signal at T0. These results were averaged from four independent experiments. The Cyanine 5 signal increased in function of duration of stay at 25°C.

#### **Figure 6. PGRP-LC internalization is enhanced after IMD activation**

S2 cells were transfected with the expression construct PGRP-LC-V5 and both membrane and internalized PGRP-LC was independently labeled, such it was already described in the previous figure. The membrane receptor was shown in green, whereas the membrane and cytosolic PGRP-LC was represented in red. Nuclei were shown in blue. PGN 80 ng/ml was simultaneously added (+PGN) or not (-PGN) to the primary anti-V5 antibodies. The antibody incubation was set for 1 hour at 4°C and more or less long time at 25°C. Cells were incubated at 25°C for 1 hour (T60min) or for 5 minutes (T5min). T0 matched to cells incubated only at 4°C. At T0 and T5, the addition of PGN led to a non-uniform membrane labeling (a “necklace” structure) compared to the control without PGN. At T60, the IMD activation enhanced the PGRP-LC internalization relatively to the control without PGN. Scale: 5  $\mu$ m.

#### **Legends to Supplemental Figures**

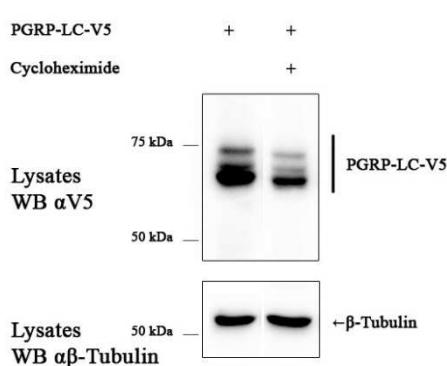
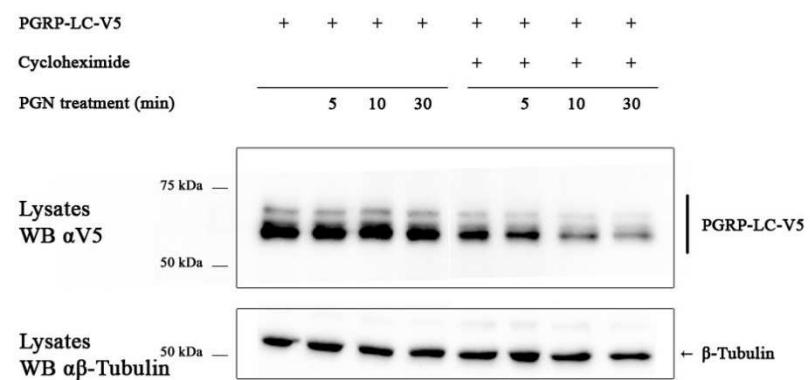
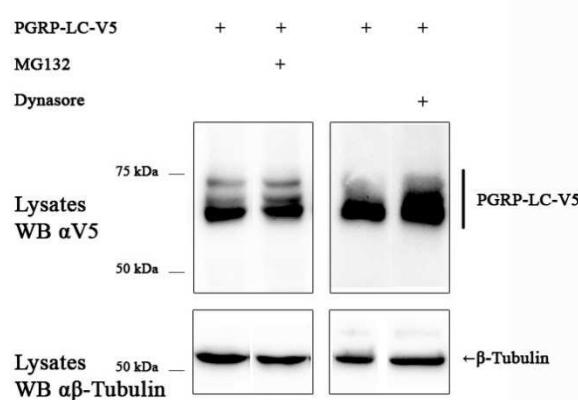
##### **Supplemental Figure 1. Dynasore treatment favors the apparition of high molecular weight bands**

S2 cells were transfected with the expression construct PGRP-LC-V5. Then, they were treated by either dynasore 80  $\mu$ M (a dynamin inhibitor) for 1 hour or not. PGRP-LC-V5 level in the inputs (unboiled or boiled 5 minutes at 95°C) was labeled with anti-V5 antibodies (Lysates  $\alpha$ V5). Anti- $\beta$ -tubulin antibodies serve as internal loading control (Lysates  $\alpha$  $\beta$ -tubulin). In the

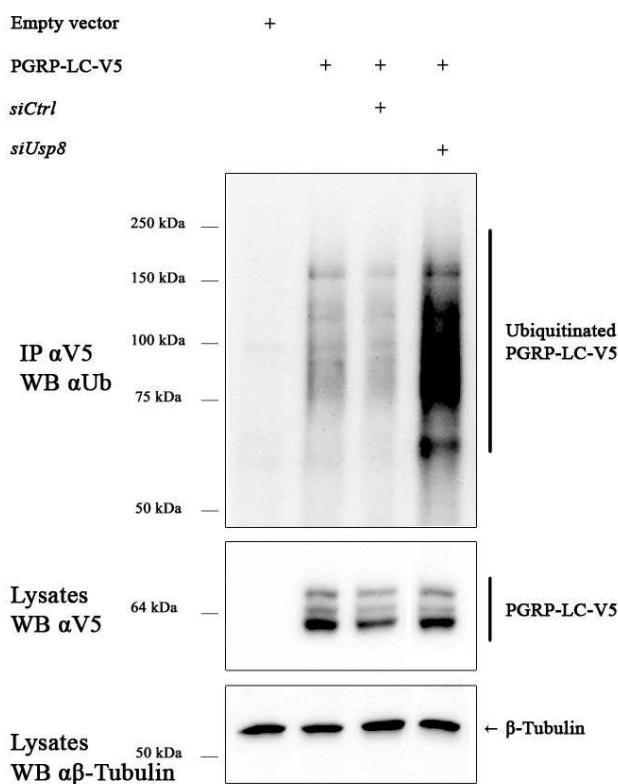
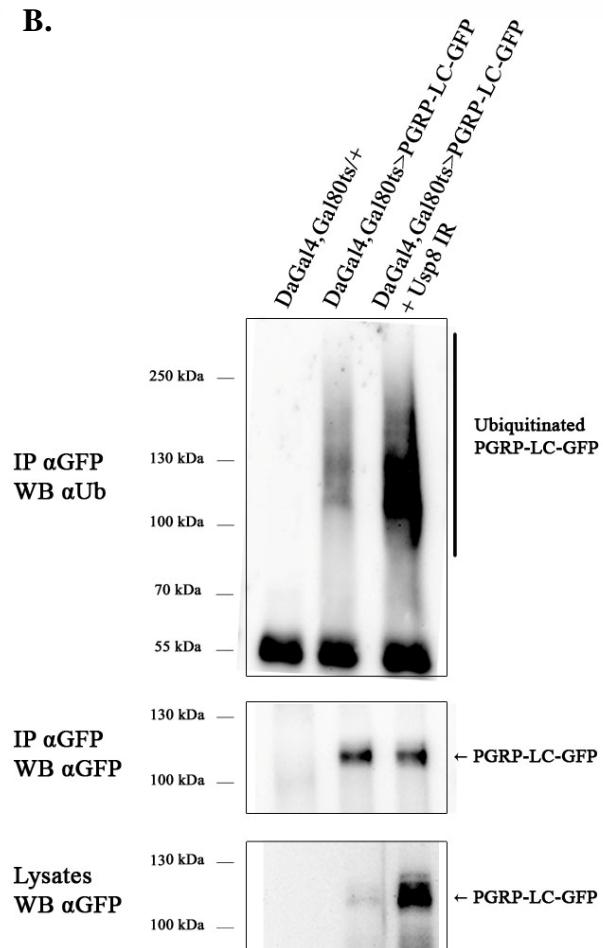
unboiled lysates, high molecular weight bands were present (\*). After boiling the lysates, the intensity of these bands decreased, while the level of PGRP-LC increased.

**Supplemental Figure 2. USP8 has a main role in the receptors down-regulation by endocytosis**

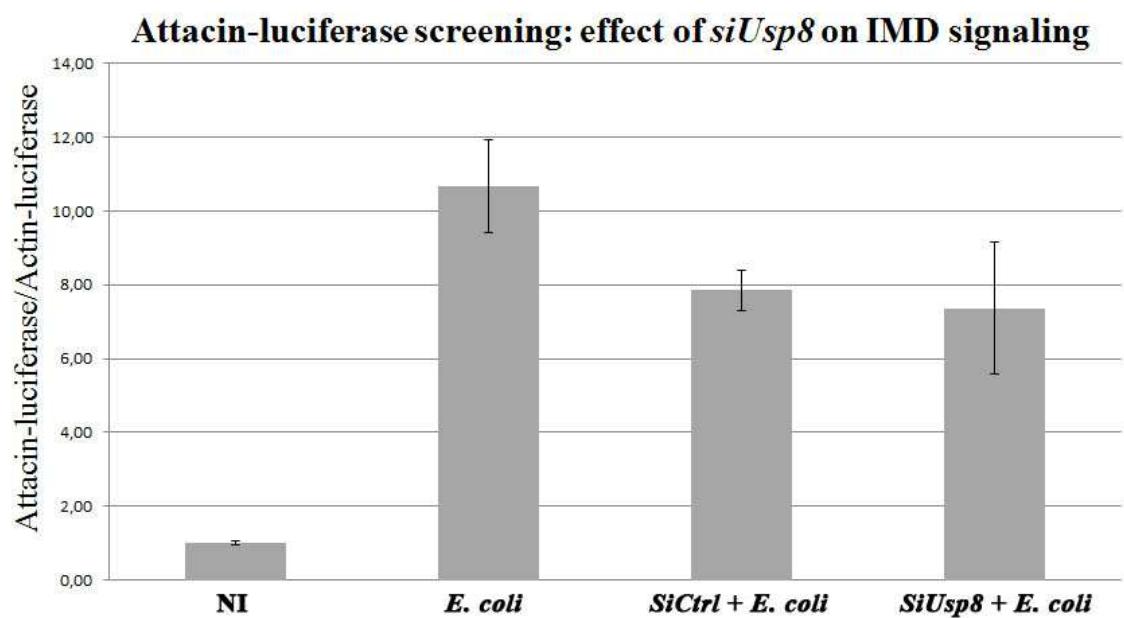
S2 cells were transfected with the expression construct PGRP-LC-V5. Rabbit produced anti-V5 antibodies were used to detect PGRP-LC-V5 and cells were incubated at 25°C for 30 minutes (T30min) or let at 4°C for one hour (T0). Then, the membrane receptor was labeled by an anti-rabbit Cyanine 5 (shown in pink). After cells permeabilization, mouse produced anti-ubiquitin antibodies were added and recognized all ubiquitinated proteins. Finally, cells were incubated with both anti-rabbit Cyanine 3 (membrane and cytosolic PGRP-LC shown in red) and anti-mouse Alexa 488 antibodies (ubiquitinated proteins shown in green). Nuclei were stained by Hoechst (shown in blue). The silencing of *Usp8* led to a general accumulation of ubiquitinated proteins in S2 cytoplasm, which matched to green aggregates. These aggregates did not exclusively colocalize with internalized PGRP-LC but they were close to the plasma membrane at T0, whereas they migrated into the cytoplasm at T30min. Scale: 5  $\mu$ m.

**A.****B.****C.**

**Figure 1. PGRP-LC degradation depends on endocytosis and is promoted by the IMD pathway stimulation (Viargues *et al.*)**

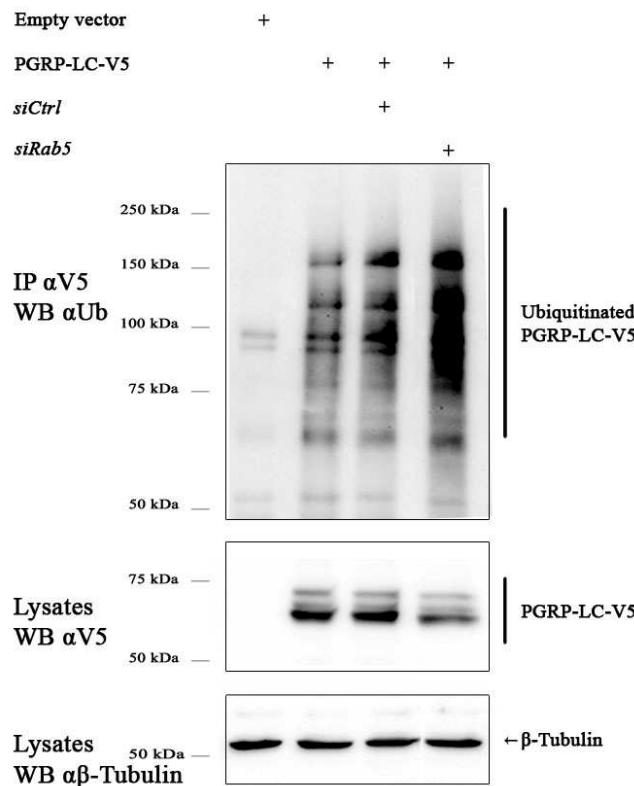
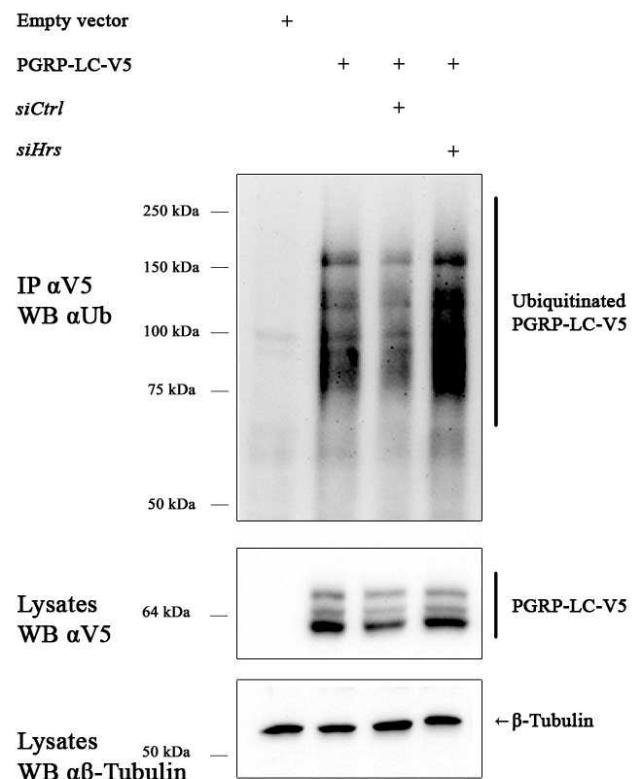
**A.****B.**

**Figure 2. Silencing of *Usp8* leads to an accumulation of ubiquitinated PGRP-LC**  
(Viargues *et al.*)

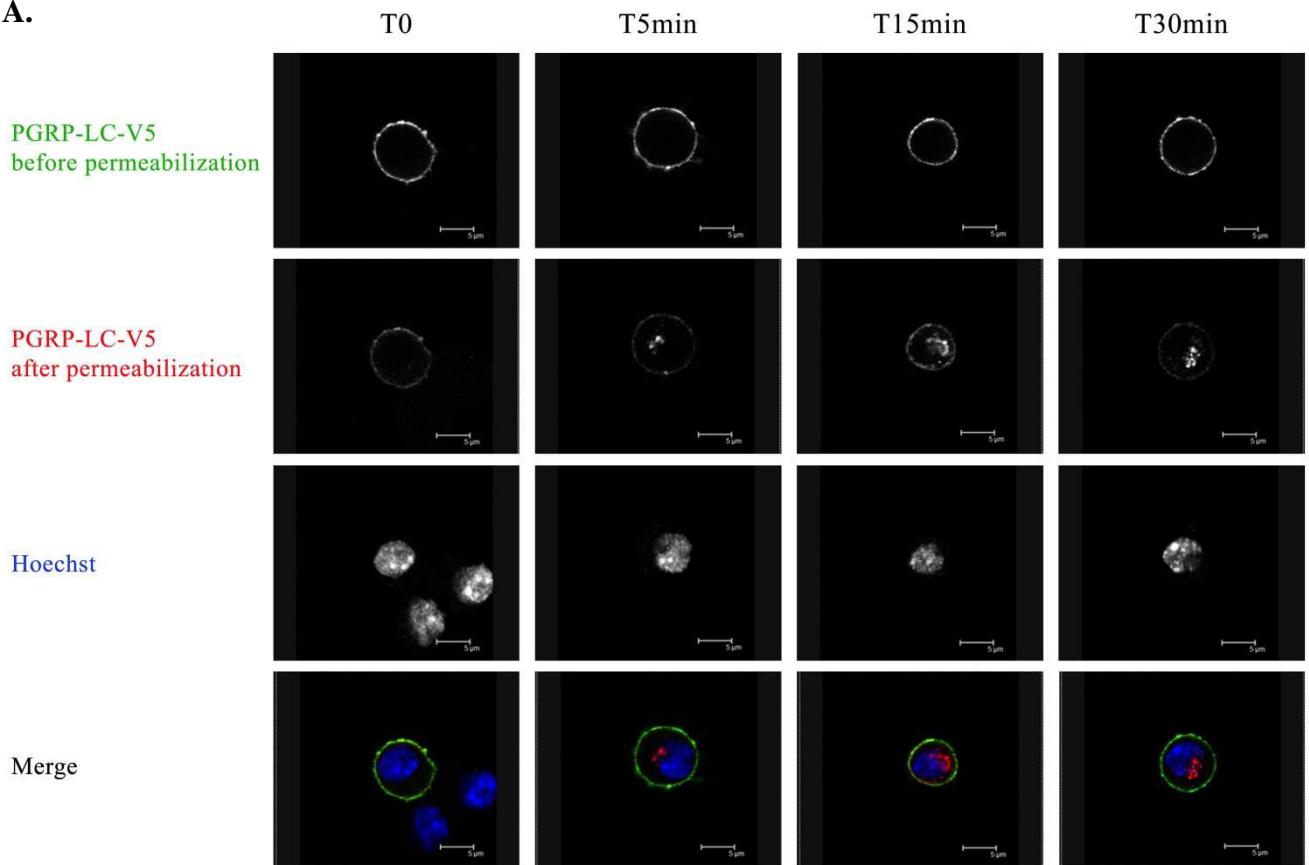
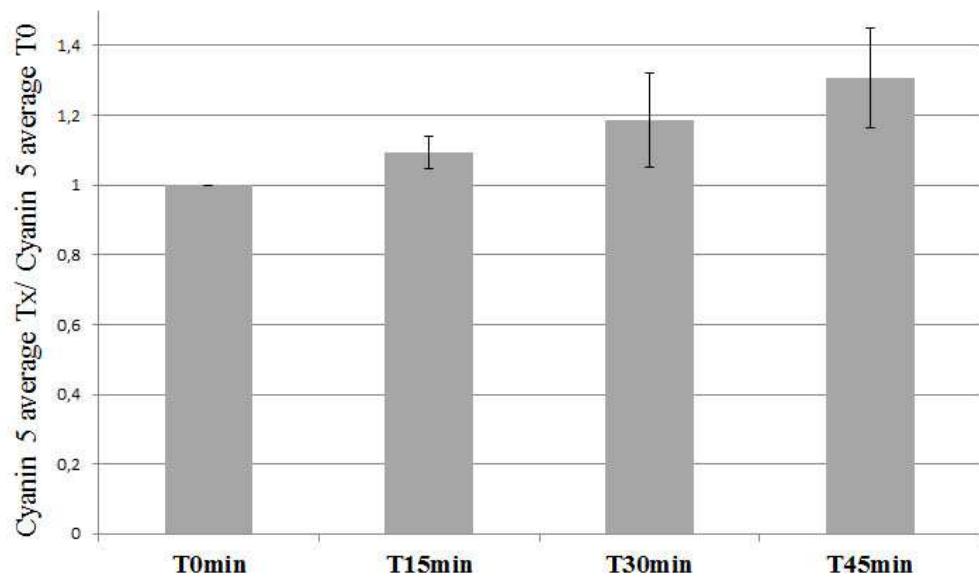


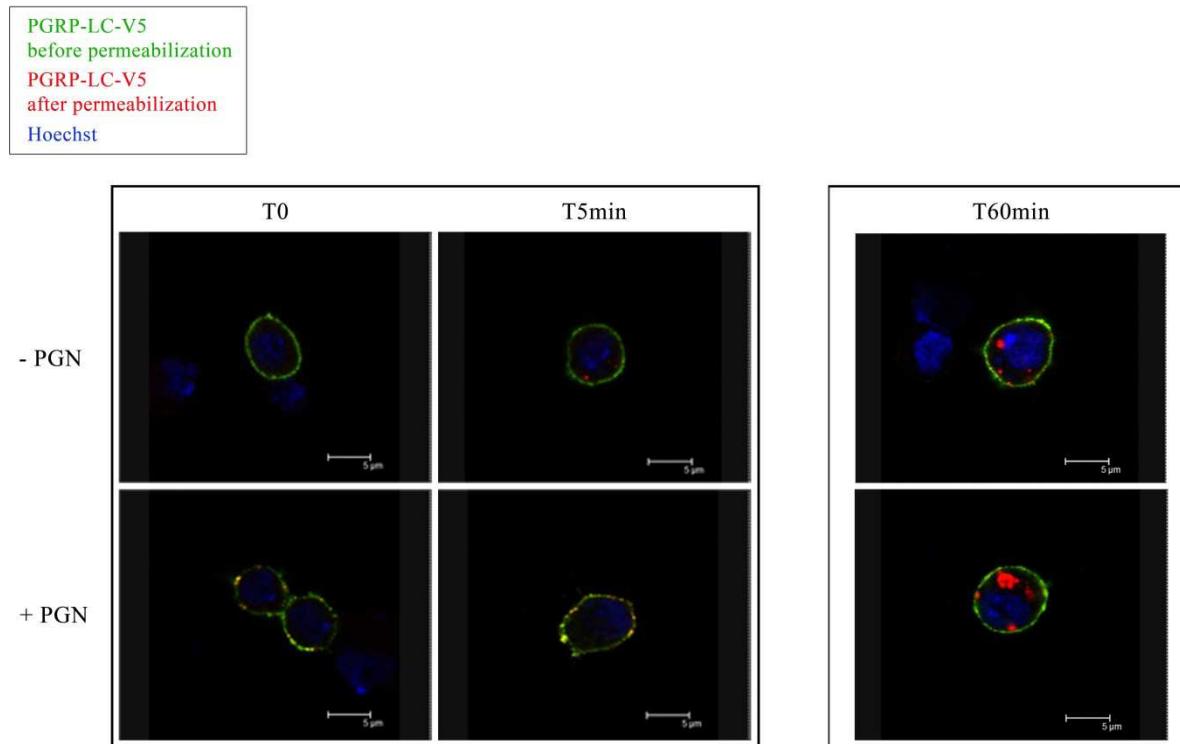
**Figure 3. Silencing *Usp8* does not interfere with the IMD pathway signaling**

(Viargues *et al.*)

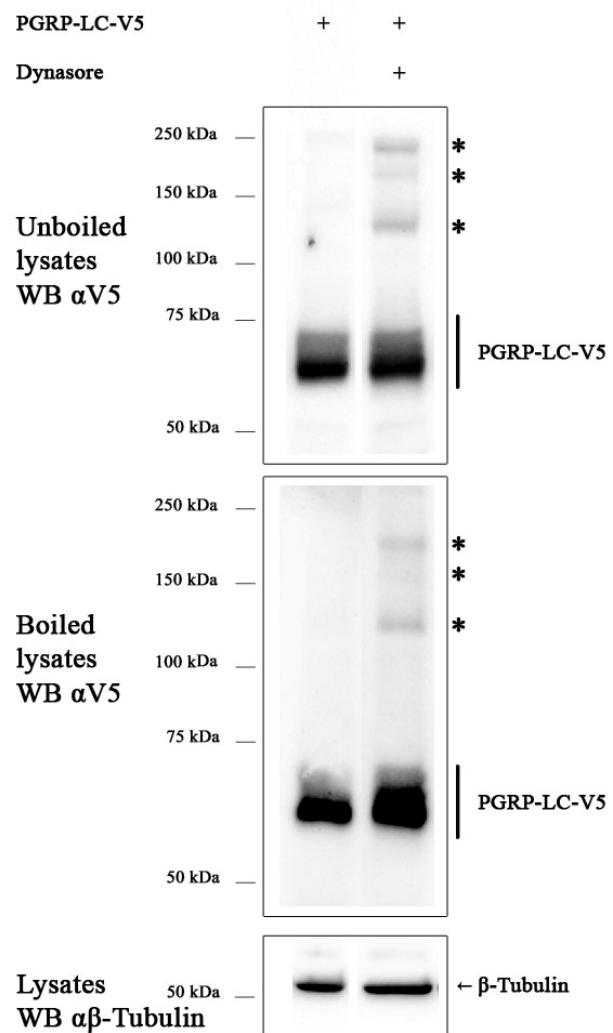
**A.****B.**

**Figure 4. Inhibition of endocytosis by dsRNAs leads to an accumulation of ubiquitinated PGRP-LC (Viargues *et al.*)**

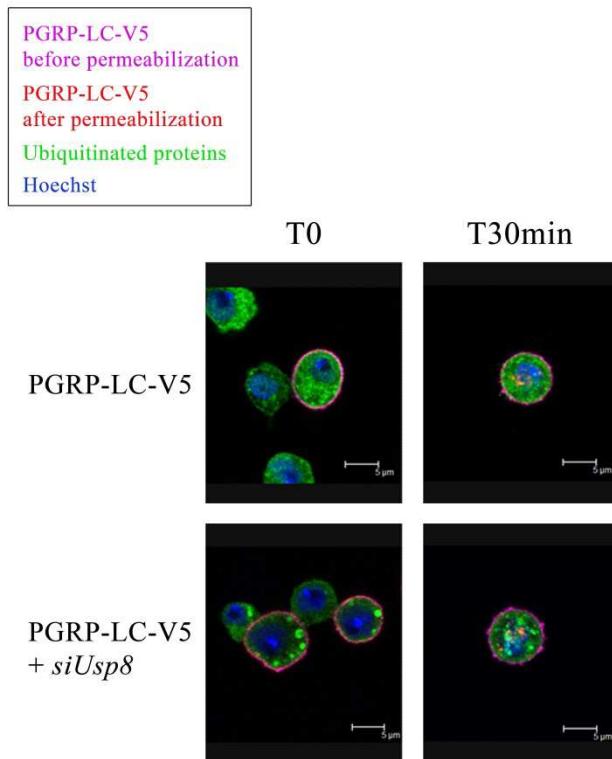
**A.****B.****Kinetic of PGRP-LC internalization****Figure 5. PGRP-LC is internalized in S2 cells (Viargues *et al.*)**



**Figure 6. PGRP-LC internalization is enhanced after IMD activation (Viargues *et al.*)**



**Supplemental Figure 1. Dynasore treatment favors the apparition of high molecular weight bands (Viargues *et al.*)**



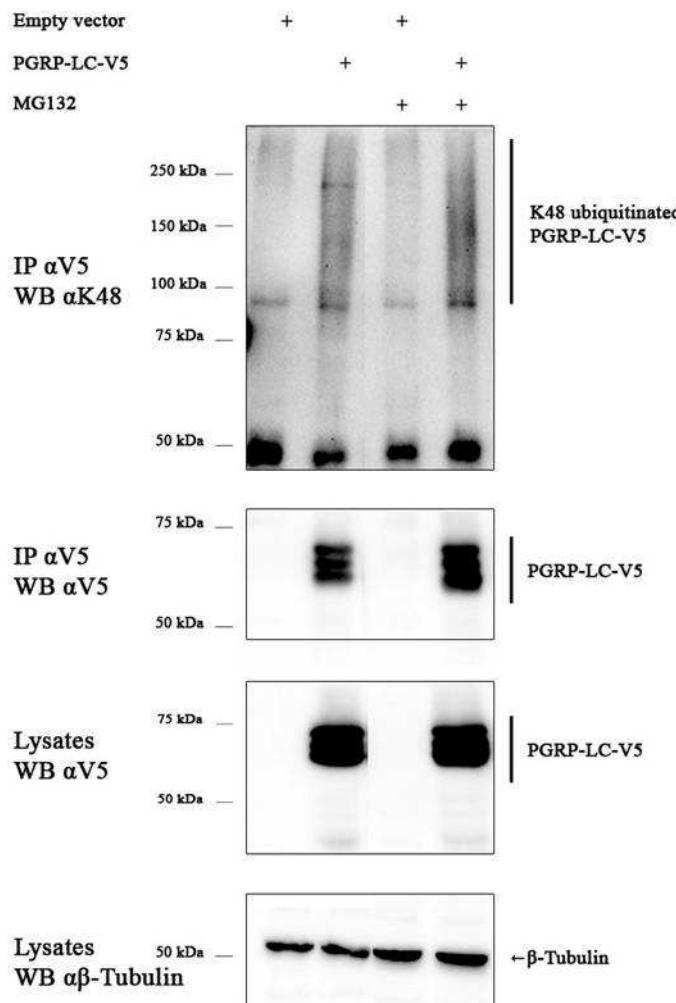
**Supplemental Figure 2. USP8 has a main role in the receptors down-regulation by endocytosis (Viargues *et al.*)**

### 3. Résultats complémentaires

#### a. Caractérisation de l'ubiquitination de PGRP-LC

Nous avons observé que PGRP-LC était ubiquitiné *in vivo* et *in cellulo* (Fig. 2, Viargues *et al.*). J'ai donc cherché à caractériser le type d'ubiquitination associée au récepteur. Pour cela, nous disposons au laboratoire d'anticorps spécifiques des chaînes de poly-ubiquitine K63 ou K48 (Clones  $\alpha$ K63 HWA4C4 et  $\alpha$ K48 Apu2, Millipore). L'immunoprecipitation de PGRP-LC-V5 a été effectuée selon le protocole décrit dans l'article Viargues *et al.* et les western blots ont été révélés avec les anticorps  $\alpha$ K63 ou  $\alpha$ K48. Bien que l'ubiquitination K63 des récepteurs membranaires soit connue pour être un signal pour le tri endosomal (Lauwers *et al.*, 2009), PGRP-LC ne semble pas être poly-ubiquitiné par ce type de chaînes (Résultats non montrés). En revanche, l'hybridation de la membrane par l'anticorps  $\alpha$ K48 révèle un «smear» pour les cellules transfectées par PGRP-LC-V5 (Fig. 21). Donc, PGRP-LC est modifiée, au moins en partie, par des chaînes de poly-ubiquitine K48. J'ai donc ensuite testé l'effet de l'inhibiteur du protéasome MG132 spécifiquement sur les formes ubiquitinées K48 de PGRP-LC et, de façon inattendue, ces formes ne sont pas accumulées de façon significative lorsque le protéasome est bloqué (Fig. 21). Ce résultat suggère que l'ubiquitination K48 de PGRP-LC ne cible pas le récepteur vers le protéasome, où il va être dégradé. Cette hypothèse est renforcée par le fait que PGRP-LC-V5 n'est pas stabilisé dans les lysats cellulaires en présence de MG132 (Fig. 1C, Viargues *et al.*). A l'opposé, dans le cas du récepteur membranaire Smoothened (Smo) qui est ubiquitiné par des chaînes K48, le traitement par MG132 conduit à une accumulation des formes ubiquitinées K48 de Smo (Li *et al.*, 2012). Dans cette étude, les auteurs montrent que Smo est à la fois multi-ubiquitiné, pour entrer dans la voie des endosomes, et poly-ubiquitiné K48 pour être envoyé vers le protéasome, depuis les endosomes tardifs. Dans le cas de PGRP-LC, les chaînes d'ubiquitine K48 pourraient contribuer à le cibler vers la voie endosomale. Mes résultats montrent donc que PGRP-LC est ubiquitiné, au moins en partie, par des chaînes de poly-ubiquitine K48 mais pas par des chaînes K63. Comme le profil du «smear» de la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC se distingue de celui obtenu en révélant avec un anticorps qui reconnaît tous types d'ubiquitination (FK2, Enzo Life Sciences), nous soupçonnons fortement que PGRP-LC est modifié par d'autre(s) type(s) d'ubiquitination qui restent à déterminer. Malheureusement, par manque d'anticorps, nous ne sommes pas en mesure de tester d'autres types d'ubiquitination,

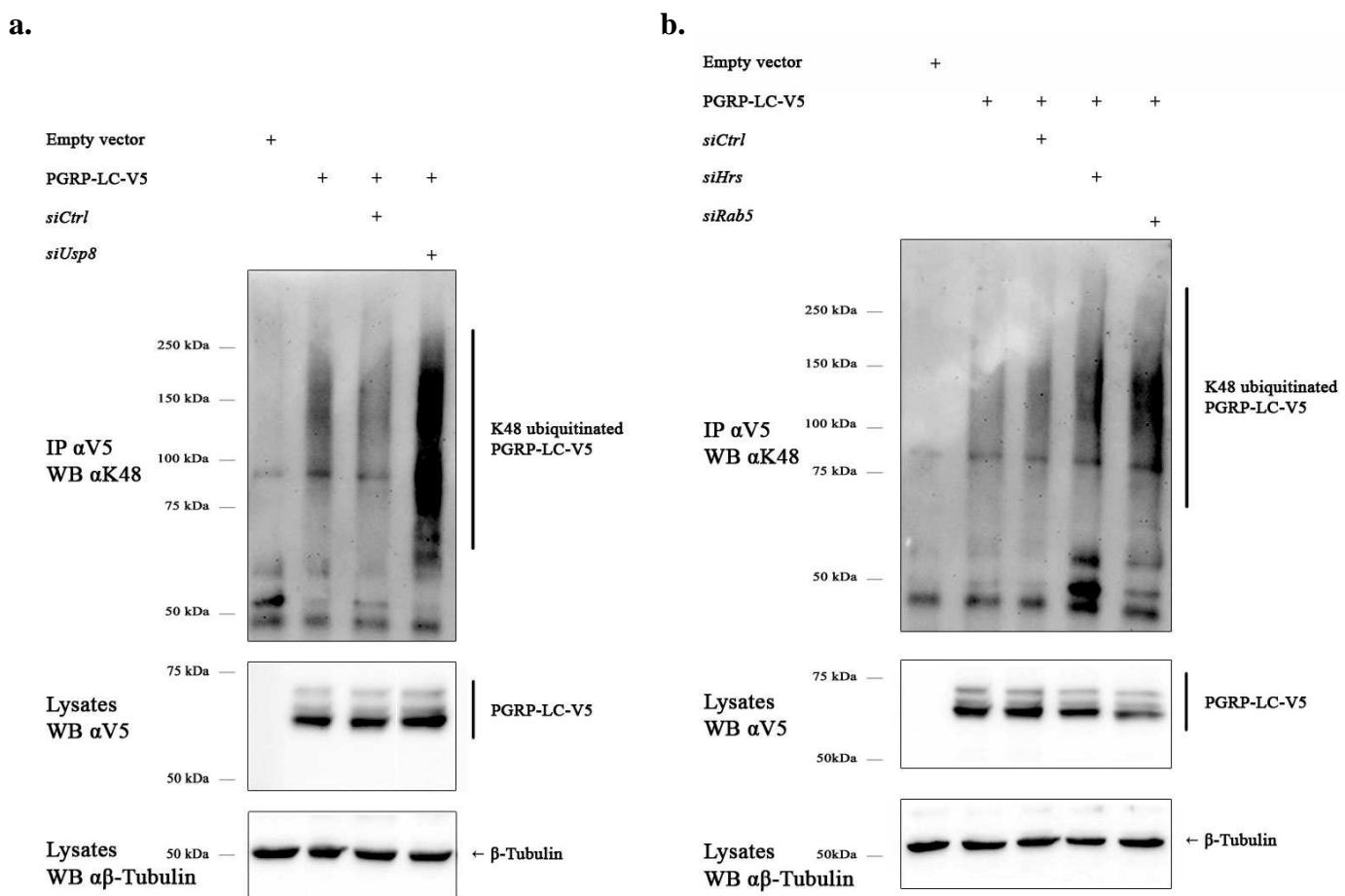
comme la multi-ubiquitination ou la poly-ubiquitination K29, déjà identifiées comme des signaux d'endocytose (Chastagner et al., 2008).



**Figure 21. La poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC ne le cible pas pour la dégradation protéasomale.** L'hybridation par des anticorps spécifiques des chaînes de poly-ubiquitine K48 montre un «smear» pour les cellules transfectées par PGRP-LC-V5. Ce récepteur est donc ubiquitiné, au moins en partie, par des chaînes K48. L'inhibition du protéasome par ajout de MG132 n'entraîne pas d'accumulation significative des formes ubiquitinées K48 de PGRP-LC. Ainsi, la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC n'est pas associée à une dégradation protéasomale.

b. Effet de l'extinction de *Usp8*, *Hrs* et *Rab5* sur la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC

L'extinction par RNAi de *Usp8* et des protéines endocytaires *Hrs* et *Rab5* entraînent une augmentation de l'ubiquitination de PGRP-LC (Fig. 2 et 4, Viargues *et al.*). J'ai également testé l'effet de ces RNAi spécifiquement sur la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC (Fig. 22). Comme pour l'ubiquitination totale de PGRP-LC, la poly-ubiquitination K48 du récepteur est augmentée en présence de *siUsp8*, *siRab5* et *siHrs* comparé aux cellules incubées avec le RNAi contrôle. Ce résultat suggère que la dégradation du récepteur PGRP-LC poly-ubiquitiné K48 dépend du processus endocytaire.

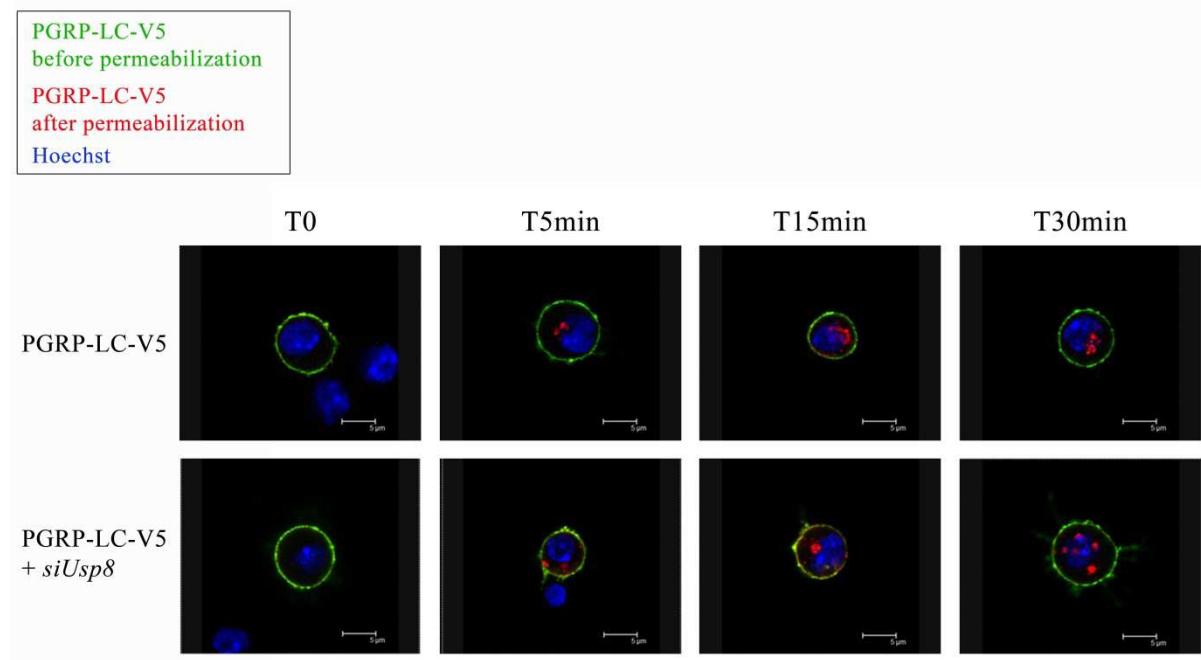


**Figure 22. Les extinctions de *Usp8*, *Hrs* et *Rab5* entraînent une augmentation des formes ubiquitinées K48 de PGRP-LC.** (a) L'extinction de *Usp8* (*siUsp8*) augmente le signal de poly-ubiquitination K48 associé à PGRP-LC, en comparaison avec le RNAi contrôle (*siCtrl*). (b) Les extinctions des gènes codant pour les protéines endocytaires *Hrs* (*siHrs*) et *Rab5* (*siRab5*) augmentent la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC, en comparaison avec *siCtrl*.

c. Effet de l'extinction de *Usp8*, *Hrs* et *Rab5* sur l'internalisation de PGRP-LC

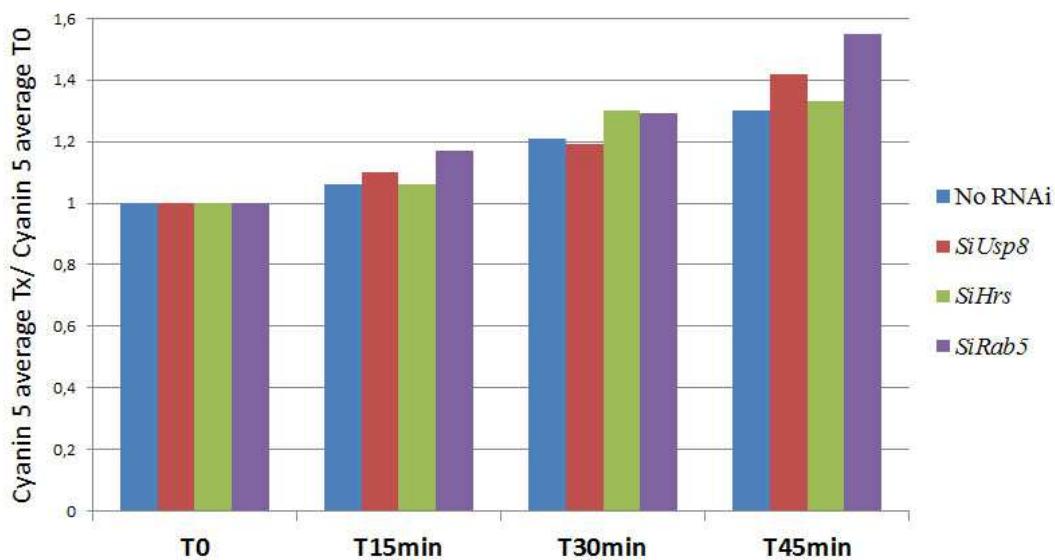
Dans un premier temps, le protocole d'immunofluorescence développé a été utilisé pour tester l'effet de l'inhibition de *Usp8* sur l'internalisation de PGRP-LC. Les cellules S2 ont été transfectées par PGRP-LC-V5 en présence ou non de *siUsp8* et l'internalisation de PGRP-LC a été permise à 25°C pendant 0 à 30 minutes (Fig. 23a). Comme les cellules transfectées ont un comportement hétérogène, il est très difficile de tirer des conclusions sur l'effet de *siUsp8* sur l'internalisation de PGRP-LC. En conséquence, j'ai utilisé la technique de cytométrie pour quantifier l'internalisation du récepteur en présence ou non *siUsp8*. L'extinction des protéines endocytaires *Hrs* et *Rab5* a également été testée au cours de cette expérience (Fig. 23b). Ce résultat est très préliminaire car l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois (ce qui explique d'ailleurs l'absence de barre d'erreur sur le diagramme). En revanche, pour les conditions «sans RNAi» et «avec *siUsp8*», la fluorescence cyanine 5 est mesurée sur un grand nombre de cellules (environ 10 000 cellules) transfectées et exprimant «moyennement» la construction PGRP-LC-V5 (fluorescence Alexa 488 comprise entre  $10^2$  et  $10^3$ ). Malheureusement, les extinctions de *Hrs* et *Rab5* semblent très délétères et je n'ai pu sélectionner, au maximum, que 6000 cellules selon les critères de fluorescence Alexa 488. D'après l'analyse des résultats de cytométrie, il semble qu'à la fois *siRab5* et *siUsp8* conduisent à une augmentation du signal Cyanine 5, c'est-à-dire celle de la quantité de PGRP-LC internalisé, pour la condition T45min. Ce résultat, s'il est significatif, suggère que les extinctions de *Usp8* et *Rab5* bloquent la dégradation de PGRP-LC, qui s'accumule dans le cytoplasme. Il serait intéressant de refaire cette expérience en élargissant la cinétique d'internalisation.

a.



b.

Effect of different RNAi on the PGRP-LC internalization



**Figure 23. Effet de l'extinction de *Usp8*, *Hrs* et *Rab5* sur l'internalisation de PGRP-LC.**  
**(a)** Observation par microscopie confocale de l'internalisation de PGRP-LC en présence ou non du *siUsp8*. Le comportement des cellules transfectées et l'expression de la construction PGRP-LC-V5 sont très hétérogènes, ce qui rend difficile d'interpréter l'effet du *siUsp8*. Echelle : 5  $\mu$ m **(b)** Pour contrer cela, j'ai quantifié l'effet des *siUsp8*, *siHrs* et *siRab5* sur l'internalisation de PGRP-LC, grâce à la technique de cytométrie. Ces résultats sont très préliminaires car l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois. A T45min, la présence de *siUsp8* et de *siRab5* semblent plutôt augmenter la fluorescence Cyanine 5, donc la quantité de PGRP-LC à l'intérieur des cellules.

## **B. Identification des USPs intervenant dans la voie IMD : l'ubiquitination différentielle de la protéine Imd régulent son activité et sa stabilité**

### **1. Résumé de l'article**

Avant mon arrivée, l'équipe avait adapté des tests luciférase en plaque 96 puits permettant de mesurer, en cellules S2, l'activation de la voie IMD et de la voie Toll après induction, respectivement, par l'ajout d'*E. coli* ou du ligand Spätzle (Engel, 2009, Thèse universitaire). Une bibliothèque d'ARN interférents (RNAi) ciblant spécifiquement chacune des DUBs identifiées chez la drosophile a également été construite. Ainsi, le cible RNAi a permis d'identifier trois USPs régulant négativement la voie IMD : USP2, USP34 et USP36 (Fig. 1A, Engel *et al.*). De façon intéressante, l'extinction de chacune de ces trois USPs entraîne également une activation constitutive de la voie IMD (Fig. 1B, Engel *et al.*). L'équipe a préalablement montré que USP36 régule négativement la voie IMD en hydrolysant les chaînes d'ubiquitine K63 associées à la protéine Imd et nécessaires à son activité (Thevenon *et al.*, 2009). Par ailleurs, parmi les déubiquitinases testées, seule USP34 régule négativement la voie Toll, en réponse à la stimulation par Spätzle ou de façon constitutive (Fig. 2, Engel *et al.*).

Les résultats des tests luciférases ont été vérifiés *in vivo*. Pour cela, les ARNs ont été extraits à partir de mouches transgéniques et la technique de RT-PCR quantitative permet de mesurer le niveau d'expression des gènes rapporteurs de l'induction des voies IMD (gènes codant pour les peptides antimicrobiens attacine et diptéricine) et Toll (gène codant pour le peptide antifongique drosomycine). Comme obtenu en cellules S2, l'extinction de *Usp34* ou de *Usp2* dans le corps gras entraîne une sur-activation significative de la voie IMD. En outre, l'extinction de *Usp34* dans le corps gras provoque également une induction constitutive de la voie Toll (Fig. 3, Engel *et al.*). Par des expériences de double extinction génique sur des mouches transgéniques, j'ai observé que la régulation négative de la voie IMD par USP2 ou USP34 nécessite la présence de la protéine Imd (Fig. 3, Engel *et al.*). La sur-activation de la voie Toll par l'extinction génique de *Usp34* dépend de la protéine adaptatrice MyD88 *in cellulo* (Fig. 2C, Engel *et al.*).

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle de USP2 dans la régulation de la voie IMD. Dans un premier temps, nous avons observé que USP2 interagit avec la protéine Imd et, préférentiellement, avec le domaine N-terminal de Imd (Fig. 4A, Engel *et al.*). Par la technique de Pull-Down, nous avons observé que la moitié N-terminale de USP2, qui ne contient pas son domaine catalytique, retient plus fortement la protéine Imd (Fig. 4B, Engel *et al.*). Après avoir vérifié *in vitro* que USP2 est une déubiquitinase active, nous avons montré *in cellulo* et *in vivo* que l'extinction de *Usp2* entraîne une augmentation de l'ubiquitination K48 de la protéine Imd. Réciproquement, la sur-expression de USP2, mais pas celle du mutant catalytique USP2mC (ou USP2C\*), diminue la poly-ubiquitination K48 de Imd, alors qu'elle n'affecte pas l'ubiquitination K63 de Imd.

La poly-ubiquitination K48 cible Imd pour la dégradation protéasomale. En effet, on observe une accumulation conjointe des formes ubiquitinées K48, de la forme entière et de la forme clivée de Imd lorsque le protéasome est bloqué par MG132. De même, l'extinction de *Usp2* s'accompagne d'une accumulation des formes poly-ubiquitinées K48, entières et clivées de Imd (Fig. 5 et 6, Engel *et al.*). Ce résultat est inattendu car comme USP2 hydrolyse les chaînes K48 associées à Imd, nous nous attendions plutôt à favoriser la dégradation de Imd en absence de cette enzyme. Au contraire, ce résultat supporte l'hypothèse que USP2 est impliquée dans la dégradation de la protéine Imd. En effet, Imd interagit avec la sous-unité 26S du protéasome et cette interaction est favorisée en présence de USP2. De plus, USP2 interagit avec la sous-unité 26S que lorsque la protéine Imd est sur-exprimée (Fig. 6, Engel *et al.*). Donc, le complexe Imd/USP2 a une plus grande affinité pour la sous-unité du protéasome que chacune de ces protéines seules.

Par ailleurs, nous avons remarqué que l'augmentation de l'ubiquitination K48 de Imd due à l'inhibition de *Usp2* n'est plus observée après infection par *E. coli*. De plus, l'infection entraîne également une stabilisation des formes poly-ubiquitinées K48, de la forme clivée et de la forme entière de la protéine Imd (Fig. 5, Engel *et al.*). Ces résultats supposent que, lorsqu'elle doit être recrutée pour la cascade de signalisation, la protéine Imd n'est plus ubiquitinée par des chaînes K48 et, en conséquence, qu'elle est stabilisée dans le cytoplasme.

En conclusion, cette étude a identifié trois régulateurs de la voie IMD : USP2, USP34 et USP36, qui régulent négativement la voie de façon au moins partiellement dépendante des éléments de la voie IMD (protéines Imd et Relish). Par ailleurs, seule USP34 régule

négativement la voie Toll et son activité dépend des composants de la voie Toll (MyD88, Dorsal/Relish). Le rôle de USP2 a plus particulièrement été étudié, dans le cadre de ma thèse. D'après les résultats obtenus, cette déubiquitinase semble fortement impliquée dans la dégradation de Imd. Nous proposons donc que USP2 permet l'envoi de la protéine Imd poly-ubiquitinée K48 vers le protéasome et/ou assure la déubiquitination de Imd avant son entrée dans le protéasome. Il est probable que l'ubiquitination K48 de Imd assure sa dégradation permanente par le protéasome, afin d'empêcher l'activation constitutive de la voie en absence d'infection. En outre, nous montrons que l'infection entraîne une stabilisation des formes entière et clivée de Imd, et la perte des formes poly-ubiquitinées K48 de façon indépendante de USP2. Cela résulte vraisemblablement du blocage de l'activité de l'ubiquitine ligase E3 catalysant l'ubiquitination K48 de Imd, qui reste à être identifiée.

## 2. Article Engel et al. (en préparation)

### Title

**Identifying ubiquitin proteases acting on *Drosophila* immune signals: differential ubiquitination of IMD regulates its activity and stability**

Elodie Engel<sup>1,2,3</sup>, Perrine Viargues<sup>1,2,3</sup>, Magda Mortier<sup>1,2,3</sup>, Emmanuel Taillebourg<sup>1,2,3</sup>,  
Dominique Thevenon<sup>1,2,3</sup>, and Marie-Odile Fauvarque<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Grenoble-Alpes, F-38000 Grenoble, France

<sup>2</sup>CEA, DSV, iRTSV, Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France.

<sup>3</sup>INSERM, U1038, F-38054 Grenoble, France.

\*corresponding author: iRTSV/BGE/Genetics &Chemogenomics, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex, France

Email : marie-odile.fauvarque@cea.fr

### One sentence summary:

USP2, USP34 and USP36 regulate *Drosophila* NF-κB pathways

**Abstract**

In *Drosophila*, TOLL and IMD NF-κB-like signalling pathways control immune response, displaying strong similarities with mammalian TLRs and TNFR pathways. These immune signals are regulated by ubiquitination of proteins modifying either their activity or their stability. To investigate how ubiquitin proteases may orchestrate signal down-regulation, we created a RNAi library targeting ubiquitin specific proteases (USP) and ubiquitin carboxyl hydrolases (UCH) selected in the *Drosophila* genome. Screening this library in *Drosophila* S2 cells identified USP2 (CG14619), USP34 (CG5794) and USP36 (Scny/CG5505) as down-regulators of the IMD pathway, and USP34 as the only negative regulator of the TOLL pathway, the three enzymes being required in both stimulated and un-stimulated cells. *In vivo* gene extinction in fat body cells of either *Usp2* or *Usp34* confirmed their negative regulatory function on the IMD or TOLL pathways while we previously demonstrated that USP36 directly prevents IMD activation by hydrolysing IMD linked K63 ubiquitin chains. We further showed that USP2 interacts with IMD and specifically hydrolyses IMD linked K48 ubiquitin chains. Silencing *Usp2* not only led to the accumulation of K48-ubiquitinated IMD but also of full-length and cleaved IMD. We further demonstrated USP2 requirement in proteasomal dependent degradation of IMD in unchallenged conditions. Strikingly, infection fully prevented IMD K48 ubiquitination indicating a regulatory mechanism inhibiting IMD degradation in response to immune challenge. Our work thus identifies three ubiquitin proteases required in *Drosophila* immune response and deciphers the specific activity of USP2 in the down-regulation of IMD dependent signal via the control of IMD homeostasis.

**Key words:** USP, IMD, Toll, RNA interference screen

## Introduction

Conjugation of ubiquitin monomers or polymers has emerged as a key mechanism for the control of the activity or the stability of proteins [1]. Whereas lysine 48-linked poly-ubiquitin chains (K48) trigger proteasomal dependent degradation of proteins, mono-ubiquitination and various kinds of other poly-ubiquitin chains, including lysine 63-linked chains (K63), regulate the activity, conformation or the subcellular localisation of proteins [2-5]. Consequently, ubiquitination regulates many cellular processes such as receptor endocytosis, DNA transcription and repair or signal transduction [6-10]. In this context, ubiquitin proteases, which hydrolyse ubiquitin moieties, form a well-defined family of proteases regulating a wide range of cellular processes and representing promising biological targets in human therapies [11-14]. The Nuclear factor Kappa-B (NF-κB) - dependent signalling pathways promoting inflammation, cell growth and innate immune signals, are notably regulated by the ubiquitination of several intermediates including scaffolding molecules, such as TRAF and RIP1, and protein kinases complexes such as Nemo, the  $\gamma$  subunit of the Iκ-B Kinase (IKK) [3, 13, 15-17]. In addition, the nuclear translocation of NF-κB requires its dissociation from its inhibitor I-κB whose proteasomal degradation is induced by its phosphorylation and subsequent K48-linked ubiquitination [18]. Following the identification of CYLD, a growing number of deubiquitinases have been found to mediate transient inhibition of NF-κB dependent pathways raising the question of specificity and functional interrelationships between ubiquitin proteases [19-27].

In *Drosophila*, two conserved NF-κB-like signalling pathways TOLL and IMD contribute to a robust innate immunity by promoting the expression of antimicrobial peptide genes in epithelial cells, circulating blood cells and fat body cells in response to infections [28-30]. The TOLL receptor is activated by binding of the processed cytokine Spätzle (SPZ) whose cleavage depends on upstream extracellular proteolytic cascades initiated by circulating Peptidoglycan Receptors proteins (PGRPs) following the recognition of various pathogens, mostly fungi and Gram-positive bacteria [31]. Activated TOLL associates with adaptor proteins dMYD88 and Tube, resulting in the activation of the serine/threonine kinase Pelle leading to phosphorylation and ubiquitination of the IκB-like molecule Cactus (CACT), and to its subsequent degradation by the proteasome [32]. CACT degradation releases NF-κB like factors, DIF and/or Dorsal (DL), which translocate to the nucleus [33] and activate a set of antimicrobial peptides genes including *Drosomycin* (*Drs*) which encodes a potent antifungal

peptide [31]. The IMD pathway is predominantly activated in response to infection by Gram-negative bacteria and results in the production of another set of antibacterial peptides, including *Diptericin* (*Dipt*) and *Attacin* (*AttA*) [33]. This pathway is induced by the direct recognition of Diaminopimelic (DAP) acids, derived from bacterial peptidoglycans via the transmembrane receptor PGRP-LC/IRD7 which associates with the cytoplasmic scaffolding protein IMD [34]. IMD associated complex mediates the activation of TAK1 which activates Kenny (KEY), the *Drosophila* IKK, and the subsequent phosphorylation of the NF- $\kappa$ B like factor Relish (REL) [35]. As in mammalian cells, a set of conserved ubiquitin ligases regulates the *Drosophila* TOLL and IMD pathways [36-42]. We have previously demonstrated that IMD is ubiquitinated by K63-linked ubiquitin chains and that the ubiquitin specific protease USP36 down-regulates signal transduction by hydrolysing IMD linked K63 chains [43].

Regulation of immune signals by ubiquitin-dependent mechanisms at several levels of the signal transduction cascade prompted us to identify other ubiquitin proteases acting in *Drosophila* immune signals. We selected twenty-one USPs and two ubiquitin carboxyl hydrolases (UCH) encoding genes and created a specific library of double strand interfering RNAs (RNAi). Screening this library in the immune competent S2 cells identified USP2, USP34 and USP36 as negative regulators of the IMD pathway and USP34 as a negative regulator of the TOLL pathway, each being required for signal down regulation both in the presence and in the absence of immune challenge. We further demonstrated here that *Usp2* or *Usp34* gene extinction in the fat body provoked a constitutive deregulation of the IMD pathway, and of the TOLL pathway in the case of *Usp34*, indicating that they are required *in vivo* to prevent constitutive activation of immune signalling. Biochemical and enzymatic assays showed that USP2 is an active deubiquitinating enzyme interacting with IMD and specifically promoting the hydrolysis of IMD linked K48 chains. Silencing *Usp2* resulted in the accumulation of K48 ubiquitinated IMD as well as cleaved and full length forms of IMD, providing a molecular explanation for the observed activation of IMD signalling. Interestingly, flies infection fully prevented K48-ubiquitination of IMD allowing for its stabilisation. We finally showed that in un-challenged condition, USP2 is required to promote IMD degradation by the proteasome and that blocking the proteasome function resulted in similar accumulation of K48 ubiquitinated, full length, and cleaved IMD, associated with a constitutive activation of the IMD pathway. Our work thus identifies three ubiquitin proteases required in *Drosophila* immune response and shows the K48 specific deubiquitinating activity

of USP2 which down-regulates IMD-dependent signal activation by controlling its homeostasis.

## Results

### Three USPs prevent IMD pathway activation in S2 cells

We selected twenty-one USPs and two UCHs encoding genes in the *Drosophila* genome following a blast analysis of ubiquitin protease catalytic site containing proteins (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Each of these genes possesses a close human homolog and has been named accordingly in this study except for those having a previous nomenclature in Flybase (Suppl. Table 1). A RNAi library was created in order to knock-down each of these ubiquitin protease encoding genes in *Drosophila* immune competent S2 cells [44]( Suppl. Table 1). Activation of the IMD pathway was achieved by adding heat-killed *E. coli* in the culture media and was monitored using the *Attacin-luciferase* (*AttA-luc*) reporter gene [45]. The *Actin-luciferase* gene (*Act-luc*) was used for signal normalisation. We have observed that silencing *Usp2*, *Usp34* and *Usp36* resulted in over-activation of the *AttA* promoter whereas silencing the other USPs or the two UCHs (*Uch* and *Uchl-L3*) encoding genes had no significant effect (Fig. 1A). This library was then used to screen for *AttA* activation in non-infected cells. Significant constitutive activation of the *AttA* reporter gene identified the same three genes (Fig. 1B). Monitoring *Usp2*, *Usp34* and *Usp36* transcripts in RNAi treated cells showed effective gene silencing (Suppl. Fig. S1). Up-regulation of the IMD pathway in *Usp2*, *Usp34* and *Usp36* silenced cells was strictly dependent on REL function since co-silencing *Rel* with each of these 3 genes fully prevented the deregulation of the *AttA* promoter (Fig. 1C). This screen thus defines USP2, USP34 and USP36 as negative regulators of antimicrobial peptide genes expression acting through the IMD pathway.

### *Drosophila* USP34 down regulates the TOLL pathway in S2 cells

Activation of the TOLL pathway was induced in S2 cells through the expression of its ligand SPZ and was monitored by the activation of a *Drs-luc* reporter construct after normalization [46]. As described in a previous study [47], we observed that both DL and REL, but not DIF, were required for TOLL mediated activation of the *Drs* promoter in S2 cells (Suppl fig. 2). As expected, silencing upstream components of the TOLL pathway, dMYD88 or SPZ, prevented

the activation of the *Drs* promoter (Suppl. Fig. S2). In contrast, silencing upstream components of the IMD pathway, *PGRP-LC*, *Imd*, *TAB2* and *Key* did not affect the induction level of *Drs* promoter induced by SPZ, indicating that REL is the sole IMD pathway intermediate contributing to TOLL-mediated activation of the *Drs* promoter in S2 cells (Suppl. Fig. S2). Screening the RNAi library in SPZ expressing cells revealed that *Usp34* is the only ubiquitin protease encoding gene whose silencing resulted in a significant enhancement of *Drs* promoter activation compared to control cells (Fig. 2A) Similarly, only the silencing of *Usp34* induced the *Drs* promoter in un-stimulated cells (Fig. 2B). Activation of the *Drs* promoter in *Usp34*-silenced cells was strictly dependent on NF-κB function (REL+DL) and on the adaptor protein dMYD88 (Fig. 2C). We conclude that USP34 is the only ubiquitin protease detected in our screen inhibiting the TOLL pathway both in stimulated and un-stimulated cells.

### **USP2 and USP34 prevent constitutive immune signalling *in vivo***

To further investigate the *in vivo* function of USP2 and USP34, we created UAS-*Usp2*-IR and UAS-*Usp34*-IR transgenic lines expressing inverted repeat of cDNA sequences allowing for gene silencing in living flies (Suppl Fig S3 A,B). Fat body directed silencing of either *Usp2* or *Usp34* resulted in a significant *Dipt* and *AttA* activation in the absence of immune challenge (Fig 3A,B). Similar results were obtained with other silencing transgenes (Suppl. Fig S3 C,D). A significant but modest 3 fold activation of *Drs* was also observed in *Usp34* silenced flies in the assayed experimental conditions (Fig 3B). Silencing *Imd* strongly prevented the constitutive activation of the pathway induced by silencing either *Usp2* or *Usp34* indicating that their activity requires IMD *in vivo* (Fig 3A,B). Moreover, over induction of the IMD pathway was observed in *Usp2* silenced flies at 3 hours following septic injury and, as expected, this activation was fully prevented in *Imd* knock-down flies (Fig 3C). Over-activation of the IMD pathway in *Usp2* silenced flies was further observed at several time points following infection (Suppl Fig S4). Our *in vivo* study demonstrates that USP2 and USP34 are required in fat body cells to prevent the constitutive activation of the IMD pathway whose activity depend on the presence of IMD. Additional investigations will be performed in the future to further analyse in details USP34 function on Toll and IMD pathways while the present study focuses on USP2 function on the IMD pathway.

## USP2 interacts with IMD

Functional analysis of USP2 suggests that its function requires IMD. By using co-immunoprecipitation assays with tagged constructs in transfected S2 cells, we observed that IMD and USP2 belong to a same protein complex and that USP2 preferentially interacts with the N-terminal part of IMD (Fig. 4A). This was also true in GST-pull down assays using GST tagged full length and truncated forms of IMD expressed as recombinant proteins in bacteria (suppl. Fig. S5). We further map the domain of USP2 mediating the interaction with IMD by using two truncated forms of GST tagged USP2. GST pull down assays showed that the USP2 Nter part retained the recombinant IMD protein to a much higher extent than the Cter part (Fig. 4B). These results indicate that USP2 interacts preferentially with the Nter part of IMD through its non-catalytic Nter domain.

## ***Drosophila* USP2 is an active deubiquitinating enzyme promoting cleavage of IMD linked K48 ubiquitin chains**

The catalytic domain of *Drosophila* USP2 (USP2<sup>CD</sup>) was expressed as a recombinant protein in bacteria expressing the Ub-β-gal fusion protein. This induced a clear cleavage of Ub-β-gal substrate (Suppl Fig S6A). Moreover, the purified USP2<sup>CD</sup> hydrolysed both synthetic K48 and K63 tetra-ubiquitin chains *in vitro* (Suppl Fig S6B). Mutations of the Cys residue critical for catalysis at position 540 to Ser (C540S) was introduced in the USP2<sup>CD</sup> sequence and resulted in a total loss of hydrolysis of either Ub-β-gal fusion protein or tetra ubiquitin chains (Suppl Fig S6A,B). These results indicate that *Drosophila* USP2 protein is an active deubiquitinating enzyme on mono and various kinds of poly-ubiquitin substrates *in vitro*.

The full length USP2 was then co-expressed with IMD in S2 cells and ubiquitinated forms of IMD were revealed with either K48- or K63- polyubiquitin specific antibodies following IMD immunoprecipitation. Whereas the level of K63 ubiquitinated IMD was not modified, the amount of K48 ubiquitinated IMD was strongly reduced in USP2-overexpressing cells (Fig. 5A). Reciprocally, K48-linked ubiquitinated IMD accumulated in *Usp2*-silenced cells (Fig. 5B). Moreover, K48 ubiquitinated IMD accumulated in cells treated with the proteasome inhibitor MG132 compared to control cells indicating that they are normally degraded by the proteasome (Fig.5A). Mutating the catalytic cysteine of USP2 prevented K48-ubiquitin chains hydrolysis in both non-treated and MG132-treated cells (Fig.5A).

To characterize USP2 enzymatic activity *in vivo*, the endogenous IMD protein was immunoprecipitated from fly extracts and detected on Western blots with either K48- or K63-

polyubiquitin specific antibodies. As observed in S2 cells, directed fat-body expression of USP2 resulted in the hydrolysis of IMD-linked K48 chains compared to control flies, while the amount of IMD-linked K63 chains remained unchanged (Fig. 5C). Reciprocally, K48-linked ubiquitinated IMD accumulated in *Usp2* silenced flies (Fig 5D). Therefore, we conclude that *Drosophila* USP2 is an active deubiquitinating enzyme promoting hydrolysis of IMD-linked K48 ubiquitin chains.

### Infection inhibits the linkage of K48 chains on IMD

In order to investigate if an immune challenge would interfere with the linkage of K48 ubiquitin chains on IMD, we immunoprecipitated the endogenous IMD protein from *E. coli* infected flies expressing or not the *Usp2* silencing transgene. The amount of full length and cleaved IMD was enhanced in *E. coli* infected control flies compared to non-infected control flies (Fig.5D). Interestingly, K48 ubiquitination of IMD was strongly decreased in *Usp2*-silenced flies following *E. coli* infection compared to non-infected *Usp2*-silenced flies (Fig. 5D). Disappearance of K48-linked ubiquitinated IMD in the absence of the deubiquitinating enzyme USP2 indicates that the linkage of K48 ubiquitin chains on IMD is actively prevented in response to immune challenge.

### IMD degradation by the proteasome is controlled by USP2 and prevents inappropriate activation of immune signal

K48 chains are well known to act as a tag for protein degradation by the proteasome. Accordingly, K48 ubiquitinated IMD accumulated in cells treated with the proteasome inhibitor MG132 compared to control cells (see above and Fig.5A). We further investigated the amount of IMD in independent experiments and observed that blocking the proteasome in S2 cells, in addition to K48-ubiquitinated IMD, also led to the accumulation of full length and cleaved IMD compared to non-treated control cells (Fig. 6A). Strikingly, silencing *Usp2* similarly provoked a strong accumulation of both cleaved and full length IMD in both non-treated and MG132-treated cells. A similar result was obtained *in vivo*: fat-body directed silencing of *Usp2* resulted in the accumulation of endogenous IMD (Fig 6B). Altogether, these results indicate that USP2 and the proteasome are functionally required for IMD turnover and degradation in non-stimulated cells.

To further investigate the putative role of USP2 in the proteasomal degradation of IMD, we assayed for direct interaction of either IMD or USP2 with the proteasome. Co-

immunoprecipitation experiments showed that IMD interacts with the proteasomal subunit 26S (Fig. 6C). This interaction was strongly enhanced in USP2 overexpressing cells (Fig. 6C). Moreover, while no interaction between USP2 and the proteasomal subunit 26S was detected in these assays, both proteins co-immunoprecipitated in the presence of overexpressed IMD (Fig. 6D). Therefore, the IMD/USP2 complex displays a higher affinity towards the proteasome than IMD or USP2 alone. Taken together, our results suggest that USP2 contributes to IMD degradation at the proteasome level.

To investigate whether accumulation of the IMD protein observed upon proteasome inhibition may functionally result in activation of the IMD pathway, we blocked proteasomal function by placing flies expressing two dominant negative proteasome subunits at restrictive temperature (30°C) for 72 hours (daGal4> UAS-pros26<sup>1ts</sup> ; UAS-prosβ2<sup>1ts</sup> flies) [48]. Monitoring *AttA* and *Dipt* expression by Q-PCR revealed a significant activation of the IMD pathway in these flies (Suppl. Fig.S7). Our results show that IMD turnover is mediated by the linkage of K48 chains acting as a tag for USP2 mediated proteasomal degradation of IMD, thus preventing IMD accumulation and subsequent activation of antimicrobial peptide genes expression.

## Discussion

In this study, we designed and screened a specific RNAi library targeting *Drosophila* ubiquitin protease encoding genes to identify novel regulatory deubiquitinating enzymes of the *Drosophila* NF-κB like signalling pathways TOLL and IMD. Interestingly, only three USPs (USP2, USP34 and USP36) were found to be required for the negative regulation of the IMD pathway and only USP34 was identified in this screen to be required for the negative regulation of TOLL dependent signalling.

Two out of their three human closest homologs, USP2 and USP34, were found to play regulatory functions in NF-κB dependent signalling in human cells. Indeed, a recent study defined USP34 as a crucial regulator of T-Cell Receptor (TCR) dependent lymphocytes activation, acting as a down-regulator of NF-κB signalling pathway [49]. In these cells, although its molecular target remains to be determined, USP34 seems to function downstream of the IKK complex, putatively on proteins regulating NF-κB activity. Similarly, in *Drosophila*, since USP34 is required for down-regulation of the two pathways TOLL and

IMD, it is tempting to speculate that it would be active on a common downstream component, such as the NF-κB-like molecule REL which is required for both IMD and TOLL pathways in S2 cells. However, activation of the *Drs* promoter or the *AttA* promoter in *Usp34*-silenced cells was also dependent on the receptor bound proteins, dMYD88 and IMD, respectively. Therefore these upstream molecules may be strictly required to ensure basal activation of NF-κB factors which could then be tightly regulated by USP34-dependent mechanisms. Alternatively, USP34 may act on other regulatory mechanisms required for signal transduction at the level of membrane receptor bound complexes.

A few studies pointed out a regulatory function of the mammalian USP2a isoform on TNFR dependent activation of NF-κB pathway. First, silencing *Usp2a* contributes to TNF $\alpha$ -dependent hepatocyte survival in mice, presumably due to an enhanced transcriptional activity of NF-κB [50]. Second, USP2 was described as a deubiquitinating enzyme hydrolysing K63 ubiquitinated chains on RIP1 thus preventing NF-κB activation while promoting caspase mediated cell death in response to TNF $\alpha$  stimulation in human cells [23]. However, a third study described a conflicting role for USP2a whose silencing would rather prevent TNFR dependent activation of NF-κB target genes [51].

Using genetic approaches in *Drosophila*, we confirmed the requirement of USP2 and USP34 in the down-regulation of immune signals *in vivo*, whereas the function of USP36 had been already described as a down-regulator of the IMD pathway, acting via the hydrolysis of IMD linked K63 ubiquitin chains [43]. Further investigations of *Drosophila* USP2 biochemical function showed that it interacts with the scaffolding molecule IMD and specifically hydrolyses IMD linked K48 ubiquitin chains, thus displaying a different ubiquitin chains specificity compared to USP36. While the linkage of K63 ubiquitin chains on IMD activates signal transduction [40, 43]; we show here that the linkage of K48 ubiquitin chains is a tag for IMD degradation by the proteasomal machinery. The two proteases USP36 and USP2 thus differentially regulate IMD dependent signalling and IMD stability, respectively. However, even if they target different ubiquitin chains with opposite functions on IMD activity, they both contribute to down-regulation of the IMD pathway.

It was first rather surprising that while USP2 promotes the cleavage of K48 chains on IMD, its silencing resulted in signal over-activation. Indeed, K48 chains acting as a tag for degradation by the proteasome, it could have been expected that silencing *Usp2*, by preventing K48-ubiquitin chains hydrolysis, would promote IMD stabilisation and subsequent

signal activation. In the opposite, silencing experiments revealed that USP2 plays an important role in IMD degradation: indeed, in *Usp2*-silenced cells, or in flies expressing a *Usp2-IR* silencing transgene, K48 ubiquitinated-, full length- and cleaved- IMD forms all accumulated indicating a clear blockage of the IMD degradation process. The simplest explanation for this result is that USP2 targets K48 ubiquitinated IMD to the proteasome and/or ensures the removal of K48 ubiquitin chains before IMD degradation by the proteasome machinery. Reinforcing the hypothesis of USP2 function in the proteasomal control of IMD degradation, we showed that IMD interacts with the 26S subunit of the proteasome and that this interaction is significantly enhanced in the presence of USP2.

The observed accumulation of full length and cleaved form of IMD in *Usp2* silenced flies probably contributes to the observed induction of IMD-dependent antimicrobial peptide genes expression. In accordance with this hypothesis, we showed that blocking the proteasome though the expression of dominant negative proteasome subunits in transgenic flies similarly resulted in the accumulation of all forms of IMD and in the ectopic activation of IMD pathway. Therefore, it is likely that linkage of K48 ubiquitin chains on IMD ensures its homeostasis through a permanent turnover of the protein. Interestingly, similar constitutive activation of *Dipt* expression was previously observed in flies expressing a dominant negative 26S proteasome subunit which also leads to REL stabilisation in un-infected flies [37]. Therefore, proteasomal activity likely plays an important function in immune signal down-regulation in un-challenged conditions, acting on several components of the pathway.

Remarkably, the accumulation of K48 ubiquitinated IMD observed in *Usp2* silenced flies fully disappeared following an immune challenge. Since *Usp2* was silenced in these flies, disappearance of K48 ubiquitinated IMD cannot be a consequence of USP2 deubiquitinating activity. Rather, we suggest that the linkage of K48 ubiquitin chains by a yet unknown E3 ubiquitin ligase is prevented following infection (Fig. 7). In accordance with this hypothesis, IMD is strongly stabilised in control challenged flies compared to unchallenged flies. Stabilisation of IMD is in accordance with its crucial requirement in signal transduction in response to infection. Therefore, it is likely that stabilisation of IMD results from the inhibition of a K48 E3 ligase whose activity would ensure a rapid turnover of the protein in the absence of immune stimulation and may be blocked in response to infection (Fig. 7).

In addition to the NF-κB pathway, a huge and increasing number of proteins and pathways seems to be controlled by USP2, which is also found to be deregulated in many cancers [52-

61]. Our demonstration of USP2 involvement in the proteasomal degradation of IMD suggests a more global function at the proteasome level than previously anticipated. It may highlight new mechanisms of action of USP2 on its targets and provide some explanation for its tumorigenic function.

## Experimental procedures

### Cell culture and RNA silencing

*Drosophila* S2 cells were maintained in Schneider's *Drosophila* medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen). Gene inactivation was obtained by incubating 0,4 µg double strand RNA (dsRNA) for 48h at 26°C with 1,2.10<sup>5</sup> S2 cells cultured in 96-well tissue culture plates (adapted from [44]). DNA templates for dsRNA synthesis were generated by PCR using the primers specific for each target gene designed from *Drosophila* RNAi screening center databases: (<http://flyrnai.org>) [62] (for Uch-L3) or (<http://www.dkfz.de/signaling2/rnai/ernai.html>) (for the 21 USPs, Uch, PGRP-LC, IMD, Tak1, Tab2, Key, Relish, Dorsal, Dif, Spätzle, dMyd88 and dTRAF2). Purified PCR products were used as DNA templates for *in vitro* transcription of RNAi using the MEGAscript RNAi kit (Ambion).

### Monitoring IMD and TOLL pathways activation in S2 cells

To monitor IMD and TOLL pathways activation, we utilised the reporter constructs *pAttA-luc* [63] and *pDrs-luc* [46], respectively. We further constructed a normalisator *pAc-luc* which allowed for Dual-luciferase reporter assay (Promega). DNA transfection was performed with 20 pg of *pAct-luc* normalisator and 2 ng of *pAttA-luc* or *pDrs-luc* 48h prior luciferase detection (ie., simultaneously with dsRNAs). To activate the IMD pathway, heat-killed *E. coli* (5.10<sup>7</sup>) were added 4 hours prior dual detection of the two luciferases. The activation of the TOLL pathway was induced by transfection of 20 ng of *pAc-Spätzle* gene (simultaneously with other constructs) [64].

### Fly strains and infections

Flies were raised on standard culture medium at 25°C. Transgenic lines were constructed in the P{UAST} vector [65]. Inverted repeats of *Usp2* and *Usp34* were cloned in the PWIZ vector [66]. The following lines were obtained from VDRC: P{UAS-*Imd-IR*} (#9253);

P{UAS-*dUsp2-IR*} (#37930) and P{UAS-*dUsp34-IR*} (#27517) [67]. Other stocks were obtained from the Drosophila Bloomington stock center. Directed expression in the fat body of *Usp-IR* transgenes was achieved by crossing *Usp-IR* flies with the c564Gal4 (c564) driver line at 25°C [68]. Flies were infected by pricking the thorax with a thin needle that had been previously dipped in a concentrated overnight culture of *E. coli* (OD<sub>600</sub> #400).

### Real-time PCR analysis

Total RNAs were extracted from adult flies using Absolutely RNA Miniprep kit from Statagene. For real-time PCR analysis, cDNAs were synthesized with AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene). An amount of cDNA equivalent to 0,01 µg of total RNA was subjected to 40 cycles of PCR amplification consisting of a 10 s incubation at 95°C and 30s at 60°C. Output was monitored using SYBR Green core reagents and the Mx3000P instrument (Stratagene). All the results were normalized to the *rpl32* RNA level. The primer sequences were designed using PrimerQuest. (<http://eu.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>)

### *In vitro* deubiquitinating assays

Mutation in the USP2 (USP2C540S) was introduced using QuickChange XL Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Wild type or mutated catalytic domains of USP2{AA 475 to 856} were expressed as GST-fusion proteins in transformed *E. coli* BL21 PlysS. To assess proteolytic cleavage of ubiquitin, GST-fusion proteins were coexpressed with Ub-β-gal fusion protein for 4 hours at 28°C in transformed *E. coli* XL1 Blue. Bacteria were lysed in 100µL Laemmli solution. Samples were subjected to SDS-PAGE (6% gel) and western blotting with a rabbit anti β-Gal antibody (ROCKLAND). To assess proteolytic cleavage of ubiquitin tetramers, GST-fusion proteins were induced for 1 hour at 25°C and purified on Gluthatione Sepharose 4B (Amersham Bioscience) from *E. coli* lysates prepared in 2 ml of Triton buffer (150 mM NaCl, 40 mM Tris pH 7.4, 0.6% Triton x 100, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 2 mM DTT, protease inhibitor cocktail SIGMA, 1 mg/ml Lysozyme). One µg of fusion proteins fixed on sepharose 4B was incubated with either K48- or K63-linked polyubiquitin substrates (Boston Biochem, Inc) in 20 µL of Phosphate buffer saline containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT for 18 hours at 37° with agitation. Samples were subjected to SDS-PAGE (11% gel) and

western blotting with a rabbit anti Ubiquitin-protein conjugates antibody (BIOMOL International)

### Immunoprecipitation and immunoblotting

Co-immunoprecipitation were performed following standard procedures in S2 cotransfected cells with 10 µg of Myc tagged full length *dUsp2* construct in pAc/HisB vector (Invitrogen) (dUSP2-Myc) and 10 µg of V5-tagged IMD full length [34]. Pull Down assay were performed in S2 cells transfected with the IMD-V5 construct and lysed after 48h. The lysate was employed in a GST-USP2 full length, or N-terminal domain {AA 1 to 531} or C-terminal domain {AA 475 to 856} pull down assays. Pull downs were blotted with antibody against V5 to detect bound IMD-V5.

### Acknowledgments

We thank Daniel Finley for powerful discussion on ubiquitin-proteasome system, Nicole Assard, Jacques Baudier, Maxim Balakirev for technical advices, Claire Bama and Christine Magnin for fly food and laboratory maintenance, Stock centers NIG fly, Indian and VDRC for sending flies. This work was supported by ARC (to MOF) and CEA-Irtelis doctoral grants (to EE and PV)

### Bibliography

1. Ciechanover, A., *Tracing the history of the ubiquitin proteolytic system: the pioneering article*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **387**(1): p. 1-10.
2. Haglund, K. and I. Dikic, *Ubiquitylation and cell signaling*. EMBO J, 2005. **24**(19): p. 3353-9.
3. Iwai, K., *Diverse roles of the ubiquitin system in NF- $\kappa$ B activation*. Biochim Biophys Acta, 2012.
4. Kim, I. and H. Rao, *What's Ub chain linkage got to do with it?* Sci STKE, 2006. **2006**(330): p. pe18.
5. McDowell, G.S. and A. Philpott, *Non-canonical ubiquitylation: Mechanisms and consequences*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(8): p. 1833-1842.
6. Geng, F., S. Wenzel, and W.P. Tansey, *Ubiquitin and proteasomes in transcription*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 177-201.
7. Haglund, K. and I. Dikic, *The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 2): p. 265-75.

8. Jackson, S.P. and D. Durocher, *Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO*. Mol Cell, 2013. **49**(5): p. 795-807.
9. Pinder, J.B., K.M. Attwood, and G. Dellaire, *Reading, writing, and repair: the role of ubiquitin and the ubiquitin-like proteins in DNA damage signaling and repair*. Front Genet, 2013. **4**: p. 45.
10. Tanno, H. and M. Komada, *The ubiquitin code and its decoding machinery in the endocytic pathway*. J Biochem, 2013. **153**(6): p. 497-504.
11. Clague, M.J., J.M. Coulson, and S. Urbe, *Cellular functions of the DUBs*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 2): p. 277-86.
12. Fulda, S., K. Rajalingam, and I. Dikic, *Ubiquitylation in immune disorders and cancer: from molecular mechanisms to therapeutic implications*. EMBO Mol Med, 2012. **4**(7): p. 545-56.
13. Harhaj, E.W. and V.M. Dixit, *Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 107-24.
14. Nijman, S.M., et al., *A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes*. Cell, 2005. **123**(5): p. 773-86.
15. Chen, J. and Z.J. Chen, *Regulation of NF-kappaB by ubiquitination*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 4-12.
16. Chen, Z.J., *Ubiquitination in signaling to and activation of IKK*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 95-106.
17. Gautheron, J. and G. Courtois, "Without Ub I am nothing": *NEMO as a multifunctional player in ubiquitin-mediated control of NF-kappaB activation*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(18): p. 3101-13.
18. Chen, Z., et al., *Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway*. Genes Dev, 1995. **9**(13): p. 1586-97.
19. Boone, D.L., et al., *The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 1052-60.
20. Brummelkamp, T.R., et al., *Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 797-801.
21. Enesa, K., et al., *NF-kappaB suppression by the deubiquitinating enzyme Cezanne: a novel negative feedback loop in pro-inflammatory signaling*. J Biol Chem, 2008. **283**(11): p. 7036-45.
22. Kovalenko, A., et al., *The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 801-5.
23. Mahul-Mellier, A.L., et al., *De-ubiquitinating protease USP2a targets RIP1 and TRAF2 to mediate cell death by TNF*. Cell Death Differ, 2012. **19**(5): p. 891-9.
24. Massoumi, R., et al., *Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling*. Cell, 2006. **125**(4): p. 665-77.
25. Mauro, C., et al., *ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB*. J Biol Chem, 2006. **281**(27): p. 18482-8.
26. Trompouki, E., et al., *CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 793-6.
27. Wertz, I.E., et al., *De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 694-9.
28. Ferrandon, D., et al., *The Drosophila systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(11): p. 862-74.
29. Ganesan, S., et al., *NF-kappaB/Rel proteins and the humoral immune responses of Drosophila melanogaster*. Curr Top Microbiol Immunol, 2011. **349**: p. 25-60.
30. Lemaitre, B. and J. Hoffmann, *The host defense of Drosophila melanogaster*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 697-743.

31. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
32. Nicolas, E., et al., *In vivo regulation of the IkappaB homologue cactus during the immune response of Drosophila*. J Biol Chem, 1998. **273**(17): p. 10463-9.
33. Lemaitre, B., et al., *Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in Drosophila*. EMBO J, 1995. **14**(3): p. 536-45.
34. Choe, K.M., H. Lee, and K.V. Anderson, *Drosophila peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 1122-6.
35. Silverman, N., et al., *A Drosophila IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity*. Genes Dev, 2000. **14**(19): p. 2461-71.
36. Chiu, H., et al., *dUbc9 negatively regulates the Toll-NF-kappa B pathways in larval hematopoiesis and drosomycin activation in Drosophila*. Dev Biol, 2005. **288**(1): p. 60-72.
37. Khush, R.S., et al., *A ubiquitin-proteasome pathway represses the Drosophila immune deficiency signalling cascade*. Curr Biol, 2002. **12**(20): p. 1728-37.
38. Leulier, F., et al., *The Drosophila inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 7821-31.
39. Meinander, A., et al., *Ubiquitylation of the initiator caspase DREDD is required for innate immune signalling*. EMBO J, 2012. **31**(12): p. 2770-83.
40. Paquette, N., et al., *Caspase-mediated cleavage, IAP binding, and ubiquitination: linking three mechanisms crucial for Drosophila NF-kappaB signaling*. Mol Cell, 2010. **37**(2): p. 172-82.
41. Tsuda, M., et al., *The RING-finger scaffold protein Plenty of SH3s targets TAK1 to control immunity signalling in Drosophila*. EMBO Rep, 2005. **6**(11): p. 1082-7.
42. Zhou, R., et al., *The role of ubiquitination in Drosophila innate immunity*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 34048-55.
43. Thevenon, D., et al., *The Drosophila ubiquitin-specific protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signaling*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(4): p. 309-20.
44. Clemens, J.C., et al., *Use of double-stranded RNA interference in Drosophila cell lines to dissect signal transduction pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6499-503.
45. Tauszig, S., et al., *Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10520-5.
46. Ferrandon, D., et al., *A drosomycin-GFP reporter transgene reveals a local immune response in Drosophila that is not dependent on the Toll pathway*. Embo J, 1998. **17**(5): p. 1217-27.
47. Tanji, T., et al., *Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in Drosophila melanogaster*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(12): p. 4578-88.
48. Belote, J.M. and E. Fortier, *Targeted expression of dominant negative proteasome mutants in Drosophila melanogaster*. Genesis, 2002. **34**(1-2): p. 80-2.
49. Poalas, K., et al., *Negative regulation of NF-kappaB signaling in T lymphocytes by the ubiquitin-specific protease USP34*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 25.
50. Haimerl, F., et al., *Down-regulation of the de-ubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 2 contributes to tumor necrosis factor-alpha-induced hepatocyte survival*. J Biol Chem, 2009. **284**(1): p. 495-504.
51. Metzig, M., et al., *An RNAi screen identifies USP2 as a factor required for TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling*. Int J Cancer, 2011. **129**(3): p. 607-18.

52. Allende-Vega, N., et al., *MdmX is a substrate for the deubiquitinating enzyme USP2a*. Oncogene, 2009. **29**(3): p. 432-41.
53. Gewies, A. and S. Grimm, *UBP41 is a proapoptotic ubiquitin-specific protease*. Cancer Res, 2003. **63**(3): p. 682-8.
54. Kim, J., et al., *The ubiquitin-specific protease USP2a enhances tumor progression by targeting cyclin A1 in bladder cancer*. Cell Cycle, 2012. **11**(6): p. 1123-30.
55. Liu, Z., et al., *The ubiquitin-specific protease USP2a prevents endocytosis-mediated EGFR degradation*. Oncogene, 2012. **32**(13): p. 1660-9.
56. Molusky, M.M., et al., *Ubiquitin-specific protease 2 regulates hepatic gluconeogenesis and diurnal glucose metabolism through 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1*. Diabetes, 2012. **61**(5): p. 1025-35.
57. Nelson, W.G., A.M. De Marzo, and S. Yegnasubramanian, *USP2a activation of MYC in prostate cancer*. Cancer Discov, 2012. **2**(3): p. 206-7.
58. Oh, K.H., et al., *Control of AIF-mediated cell death by antagonistic functions of CHIP ubiquitin E3 ligase and USP2 deubiquitinating enzyme*. Cell Death Differ, 2011. **18**(8): p. 1326-36.
59. Shan, J., W. Zhao, and W. Gu, *Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation*. Mol Cell, 2009. **36**(3): p. 469-76.
60. Shi, Y., et al., *Ubiquitin-specific cysteine protease 2a (USP2a) regulates the stability of Aurora-A*. J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 38960-8.
61. Tong, X., et al., *USP2a protein deubiquitinates and stabilizes the circadian protein CRY1 in response to inflammatory signals*. J Biol Chem, 2012. **287**(30): p. 25280-91.
62. Flockhart, I., et al., *FlyRNAi: the Drosophila RNAi screening center database*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D489-94.
63. Tauszig-Delamasure, S., et al., *Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections*. Nat Immunol, 2002. **3**(1): p. 91-7.
64. Morisato, D. and K.V. Anderson, *The spatzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo*. Cell, 1994. **76**(4): p. 677-88.
65. Brand, A.H. and N. Perrimon, *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development, 1993. **118**(2): p. 401-15.
66. Lee, Y.S. and R.W. Carthew, *Making a better RNAi vector for Drosophila: use of intron spacers*. Methods, 2003. **30**(4): p. 322-9.
67. Dietzl, G., et al., *A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila*. Nature, 2007. **448**(7150): p. 151-6.
68. Hrdlicka, L., et al., *Analysis of twenty-four Gal4 lines in Drosophila melanogaster*. Genesis, 2002. **34**(1-2): p. 51-7.

**Figure legends****Figure 1: USP2, USP34 and USP36 negatively regulate the IMD pathway**

*Drosophila* S2 cells were co-transfected with *pAttA-luc* reporter gene and *pAc-luc* normalisator to measure the activation of the IMD pathway in the presence of heat-killed *E. coli* (A, C) or in the absence of elicitor (B). NI: not infected control (A,C). Sequence specific long dsRNAs were added into the media to silence indicated target genes (indicated siGeneName). Histograms represent the % of induction compared to *siGFP* treated control cells. A. Compared to control cells, *siRel* prevents the *AttA-luc* induction by *E. coli* while *siUsp36*, *siUsp2* or *siUsp34* results in a significant over-activation of *AttA-luc*. B. Cells treated with *siUsp36*, *siUsp2* and *siUsp34* present a constitutive activation of *AttA-luc* in the absence of immune challenge. C. Silencing *Rel* prevents the effect of silencing *Usp36*, *Usp2* and *Usp34* as observed in double siRNAs treated cells. One out of three independent experiments is shown. Error bars indicate standard deviation of technical triplicates.

**Figure 2: USP34 is a negative regulator of the Toll pathway**

S2 cells were co-transfected with *pDrs-luc* reporter gene and *pAc-luc* normalisator to measure the activation of the TOLL pathway in the presence of *pAc-Spz* (A, C) or in the absence of elicitor (B). NI: not induced control (A,C). Sequence specific long dsRNAs were added into the media to silence the indicated target gene (indicated siGeneName). Histograms represent the % of induction compared to *siGFP* treated control cells (100%). A. Silencing *Usp34* in the presence of *pAc-Spz* results in over-activation of *Drs-luc*. B. Cells treated with *siUsp34* in absence of elicitor present constitutive activation of *Drs-luc*. D. Silencing either (*Rel+Dorsal*) or *Myd88* prevents the constitutive activation of *Drs-luc* induced by silencing *Usp34*. One representative experiment out of three is shown. Error bars indicate standard deviation between technical triplicates.

**Figure 3: USP2 and USP34 prevent constitutive activation of immune signalling *in vivo***

Quantitative analysis of *Dipt*, *AttA* and *Drs* mRNAs by real-time Quantitative PCR. A,B : histograms present the fold activation of each indicated antimicrobial peptide gene compared to c564Gal4/+ control flies raised in similar conditions. A. *Dipt* and *AttA* expression level in either c564>*Usp2-IR* (c564>*Usp2-IR*) or c564>*Usp2-IR;Imd-IR/+* (c564>*Usp2-IR;Imd-IR*) silenced flies compared to control flies (c564/+). B. *Dipt* *AttA* and *Drs* expression levels in

either c564/Usp34-IR (c564>Usp34-IR) or c564/Usp34-IR;Imd-IR/+ (c564>Usp34-IR;Imd-IR) silenced flies compared to control flies (c564/+). C. Activation of each indicated antimicrobial peptide gene at 3 hours post *E. coli* infection expressed as a % of activity compared to infected c564Gal4/+ flies.

**Figure 4: USP2 interacts with IMD**

A. *Drosophila* S2 cells were cotransfected with the expression constructs encoding USP2-Myc and either IMD-V5, or IMD-Nter-V5 or IMD-Cter-V5. Cells lysates were coimmunoprecipitated with either anti-V5 or anti-Myc antibodies and analysed by western blot with either anti-Myc or anti-V5 antibodies as indicated. Presence of recombinant proteins in the whole cell lysate was assessed by western blot of cell extracts with anti-Myc or anti-V5 antibodies. B. S2 cells were transfected with the expression construct encoding IMD-V5 and lysed after 48 h. Cells lysates were precleared and subjected to GST pull down assays using GST fusion proteins with either the dUSP2{1-531} N-Terminal part (dUSP2Nter) or the dUSP2{475-856} C-terminal part (dUSP2Cter) or with GST alone (GST). Gel was coloured with Coomassie to visualize GST-fusion proteins in the input (bottom part).

**Figure 5 USP2 hydrolyses IMD linked K48 ubiquitin chains**

A. *Drosophila* S2 cells were cotransfected with the expression constructs encoding IMD-V5 and either wild type USP2 (*pAc-Usp2*) or catalytically inactive mutant USP2C540S (*pAc-Usp2C\**). IMD was immunoprecipitated with anti-V5 antibodies and IMD ubiquitinated forms were detected by western blot with antibodies specific for either K63- or K48-linked ubiquitin chains as indicated. Presence of IMD in the whole cell lysate was assessed by western blot of cell extracts with anti-V5 antibodies. Anti-tubulin antibodies served as loading control. B. Same experiments as in A in the presence or not of dsRNA silencing *Usp2* gene expression (*siUsp2*). C. Endogenous IMD was immunoprecipitated with antibodies raised against IMD from extracts of c564/+ control, c564/P{UAS-USP2} (indicated c564>Usp2) or c564/P{UAS-USP2C\*} (indicated c564>Usp2\*) flies. Ubiquitinated forms of IMD were detected by western blot with antibodies specific for either K48- or K63- linked ubiquitin chains. The amount of endogenous IMD proteins was detected in total fly extracts with IMD antibodies. Anti-tubulin antibodies served as loading control on total fly extracts. D. Endogenous IMD was immunoprecipitated with antibodies raised against IMD from extracts of c564/+ control or c564/P{UAS-Usp2-IR} (indicated c564>Usp2-IR) flies, which were

infected or not by *E. coli*. Ubiquitinated forms of IMD were detected by western blot with antibodies specific for K48-linked ubiquitin chains. The amount of endogenous IMD proteins was detected in total fly extracts with IMD antibodies. Anti-tubulin antibodies served as loading control on total fly extracts.

### Figure 6 IMD proteasomal degradation requires USP2

A. *Drosophila* S2 cells were transfected by the expression constructs encoding IMD-V5 and treated by the dsRNA silencing *Usp2* gene expression (si*Usp2*) or a dsRNA control. Cells were incubated or not with MG132 at 20  $\mu$ M or cycloheximide at 8 mg/ml for 4 hours. The amount of IMD in lysates was revealed with anti-V5 antibodies. Anti-tubulin antibodies served as loading control on whole cells extracts. B. Endogenous IMD was revealed with antibodies raised against IMD from extracts of c564/+ control or c564/P{UAS-*Usp2*-IR} (indicated c564>*Usp2*-IR) flies. Anti-tubulin antibodies served as loading control on total fly extracts. C. *Drosophila* S2 cells were cotransfected with the expression constructs encoding IMD-V5 and either USP2 expressing construct (pAc-*Usp2*) or a control plasmid. IMD was immunoprecipitated with anti-V5 antibodies and endogenous 26S proteasome subunit was detected. Cells lysates were revealed with anti-V5 and anti-26S antibodies. D. *Drosophila* S2 cells were cotransfected with the expression construct encoding USP2-Myc and either IMD expressing construct (pAc-IMD) or a control plasmid. USP2 was immunoprecipitated with anti-Myc antibodies and endogenous 26S proteasome subunit was detected. Cells lysates were revealed with anti-Myc and anti-26S antibodies.

### Figure 7 USP2 and USP36 differentially control IMD ubiquitination and signalling

IMD is subjected to a permanent turnover via the linkage of K48 ubiquitin chains and subsequent proteasomal degradation preventing IMD accumulation and signal activation. This pathway is promoted by a yet unknown E3 ubiquitine ligase and the deubiquitinating enzyme USP2 which is required for IMD degradation. In response to an immune challenge, the activity of the E3 ligase would be prevented resulting in the observed IMD stabilisation and accumulation allowing for immune signal transduction and activation. As previously shown, USP36 deubiquitinates IMD linked K63 chains thus preventing signal transduction and eventually promoting ubiquitin chain editing through the replacement of activating K63 chains by K48 degradative chains [43].

**Legends to Supplemental Figures****Supplemental Table 1: Ubiquitin proteases screened on IMD and TOLL pathways**

All primers were designed from (<http://www.dkfz.de/signaling2/rnai/ernai.html>) except for \*UCH-L3 designed from DRSC (<http://flyrnai.org>) [62].

**Supplemental Figure S1: dUSP2, dUSP34 and dUSP36 are inactivated by dsRNA in S2 cells**

Quantitative analysis of *Usp36*, *Usp2* and *Usp34* mRNAs by real-time Quantitative PCR in S2 cells incubated 48 hours with double stranded RNA targeting *Usp36*, *Usp2* or *Usp34* (indicated as si*Usp36*, si*Usp34* and si*Usp2*).

**Supplemental Figure S2: DL and Rel but not Dif mediate activation of Drs promoter in S2 cells**

S2 cells were co-transfected with *pDrs-luc* reporter gene and *pAc-luc* normalisator to measure the activation of the TOLL pathway in the presence of *pAc-Spz* (A, B, D) or in the absence of elicitor (B). NI: not induced control (A,C,D). Sequence specific long dsRNAs were added into the media to silence the indicated target gene (indicated siGeneName). Histograms represent the % of induction normalised in *siGFP* treated control cells (100%). Compared to cells treated with *siGFP*, silencing *Dif* did not prevent *Drs-luc* induction by *pAc-Spz* whereas silencing other components of the TOLL pathway: *Dorsal (Dl)*, *Myd88* or *Spz* inhibited the induction of the TOLL pathway. Silencing upstream components of the IMD pathway (*Key*, *dTAK1*, *dTAB2*, *Imd* or *PGRP-LC*) had no effect on the induction of *Drs-luc*, except in the case of the NF-κB-like factor *Rel* demonstrating that REL is necessary for activation of the TOLL pathway by SPZ in S2 cells.

**Supplemental Figure S3 : Second RNAi lines shows immune signal deregulation**

Quantitative analysis of *Dipt*, *Usp2* and *Usp34* mRNAs by real-time Quantitative PCR. Histograms present the fold activation of each indicated antimicrobial peptide gene compared to control flies raised in similar conditions. A. *Usp2* expression level in HS>Usp2-IR (5M) and in HS>shCG14619 ID37390 compared to control flies (HS/+). B. *Usp34* expression level in NP1>Usp34-IR (1M) and in NP1>shCG5794 ID27517 compared to control flies (NP1/+). *Dipt* expression level in c564>shCG14619 ID37390 (C) and c564>shCG5794 ID27517 (D) compared to control flies (c564/+).

**Supplemental Figure S4: Silencing USP2 induces overactivation of the IMD pathway at several time points following infection**

Quantitative analysis of *Dipt* and *AttA* mRNAs by real-time Quantitative PCR. Histograms the % of induction of each indicated antimicrobial peptide gene compared to control flies raised in similar conditions and 3 hours post-infection. *Dipt* and *AttA* expression level in c564>Usp2-IR compared to control flies (c564/+).

**Supplemental Figure S5 : USP2 preferentially interacts with IMD Nter part**

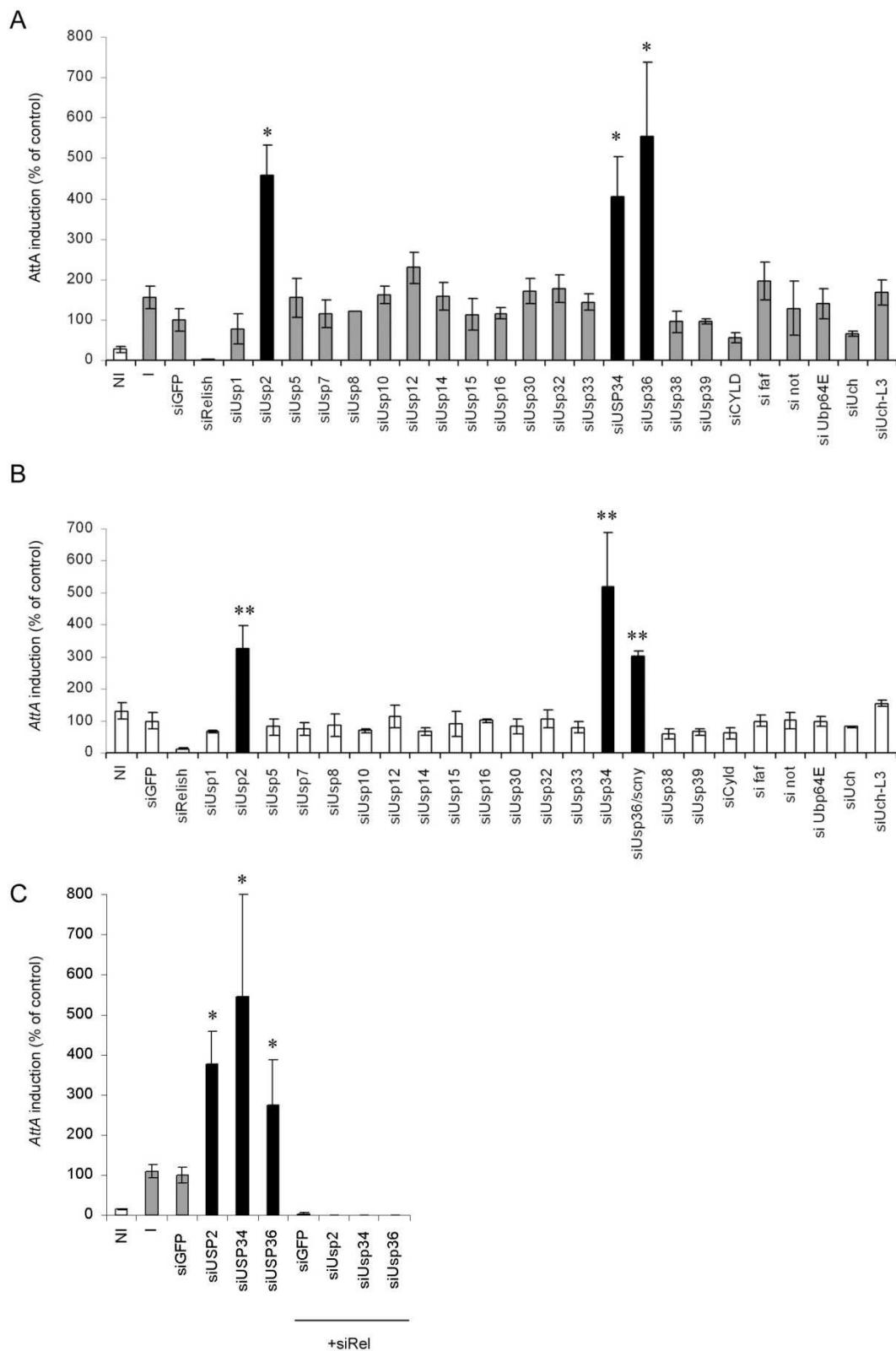
*Drosophila* S2 cells were cotransfected with the expression constructs encoding USP2-Myc and lysed after 48 h. Cells lysates were precleared and subjected to GST pull down assays using GST fusion proteins with the full length IMD, the IMD N-Terminal part or the IMD C-Terminal part. USP2-Myc was detected by western blot with anti-Myc antibodies.

**Supplemental Figure S6: *Drosophila* USP2 is an active ubiquitin protease *in vitro***

A. GST-fusion proteins were coexpressed with Ub-β-gal fusion protein for 4 hours at 28°C in transformed *E. coli* XL1 Blue. Substrate cleavage was analysed by western blotting with anti-βgal antibodies. Wild type or mutated catalytic domain of USP2 and wild type catalytic domain USP34{1933-2459} were expressed as GST-fusion proteins and purified from transformed *E. coli* BL21 PlyS. B,C. Purified proteins were incubated with K48- or K63-linked tetra ubiquitin chains. Substrate cleavage was analysed by western blotting with anti-Ub antibodies. A. Proteolysis of Ub-βgal results in a shift to a lower weight band. B. Proteolysis of either K48- or K63-linked tetra ubiquitin chains results in the accumulation of ubiquitin monomers. Mutating the catalytic conserved residue Cys to Ser (C540S) in the dUSP2 sequence (indicated dUSP2C\*) prevented ubiquitin hydrolysis (A,B,C).

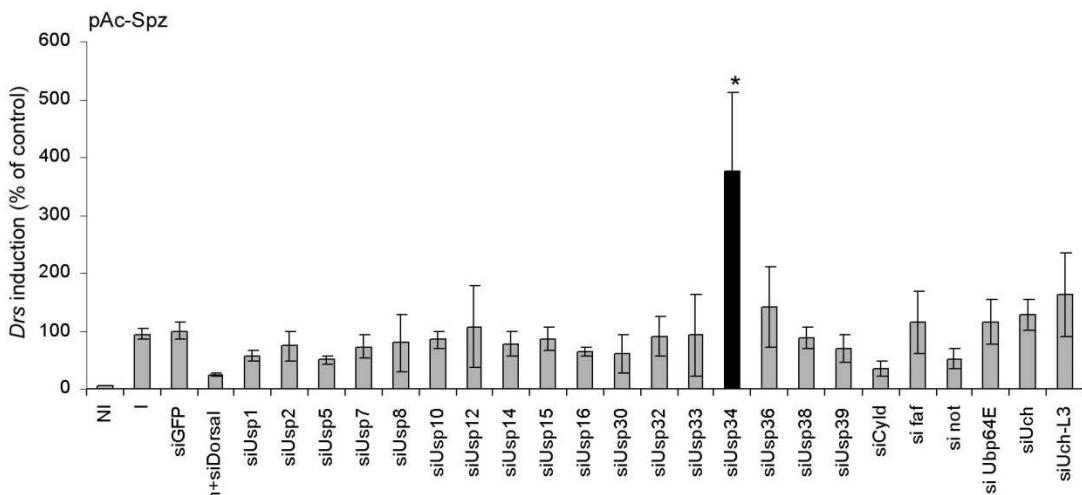
**Supplemental Figure S7 Blocking the proteasome induces the IMD pathway**

Quantitative analysis of *Dipt* and *AttA* mRNAs by real-time Quantitative PCR. Histograms present the fold activation of each indicated antimicrobial peptide gene compared to c564Gal4/+ control flies raised in similar conditions. *Dipt* and *AttA* expression level in c564>Pros26[1]; Prosbeta[1] flies compared to control flies (c564/+).

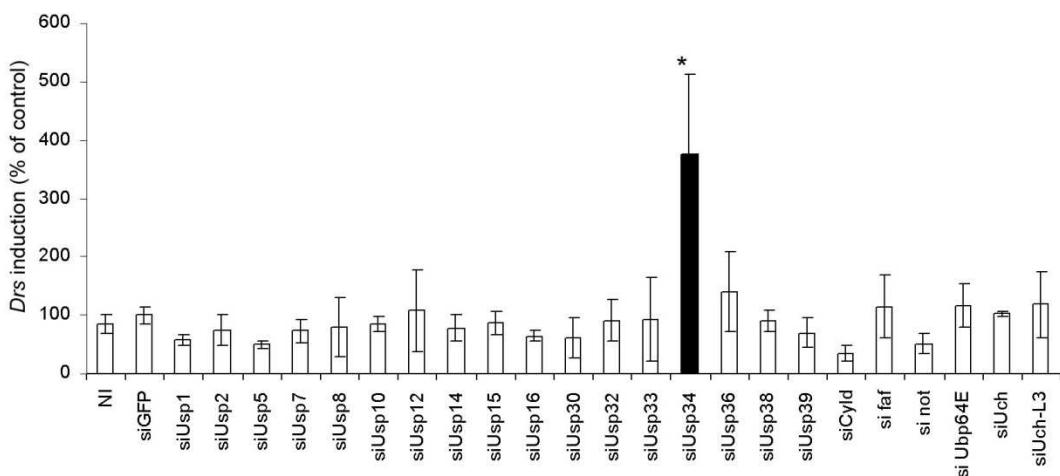


**Figure 1. USP2, USP34 and USP36 negatively regulate the IMD pathway**  
(Engel *et al.*)

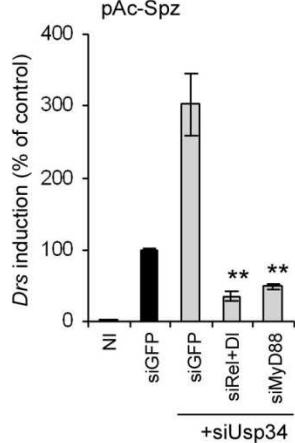
A

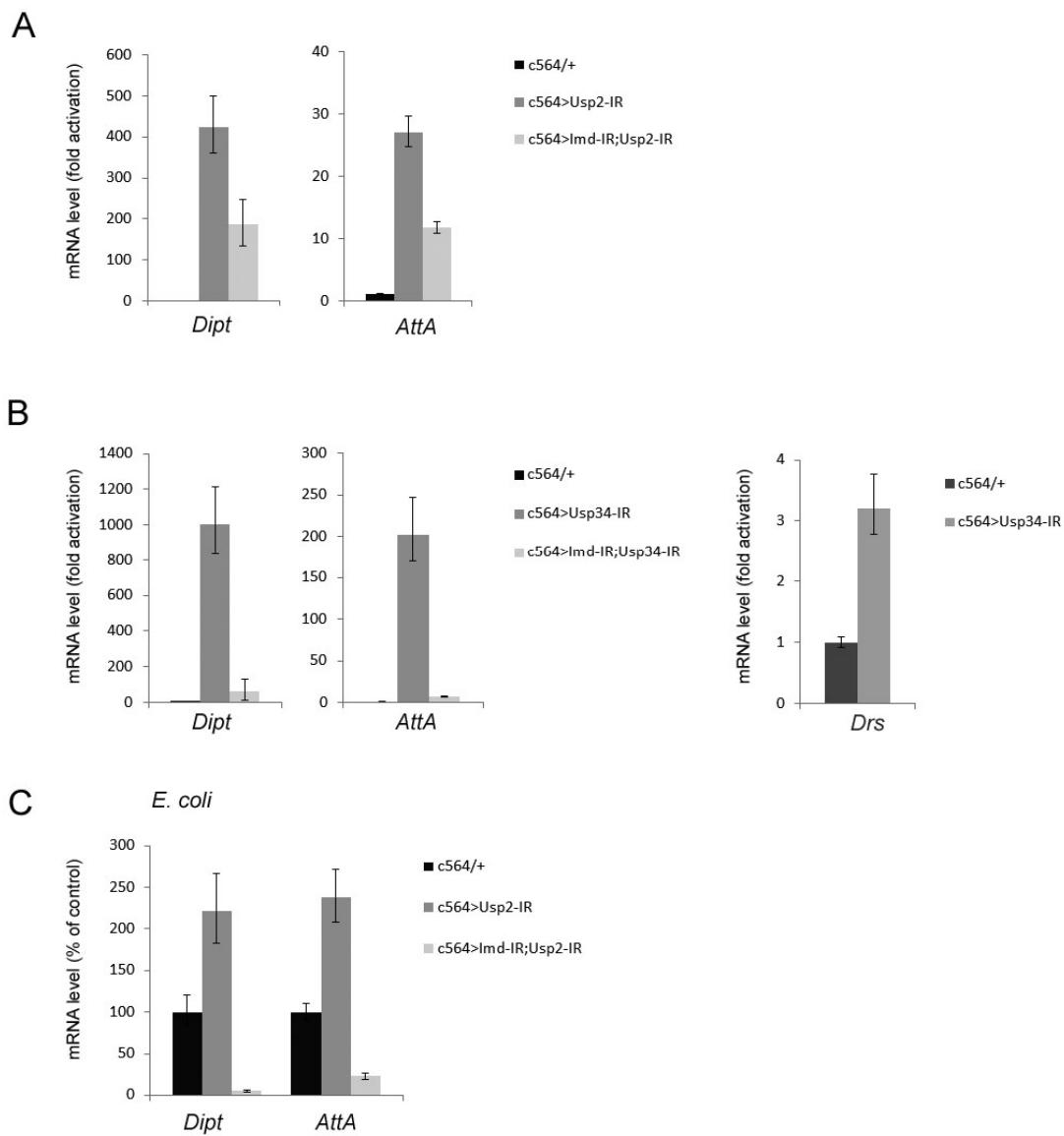


B

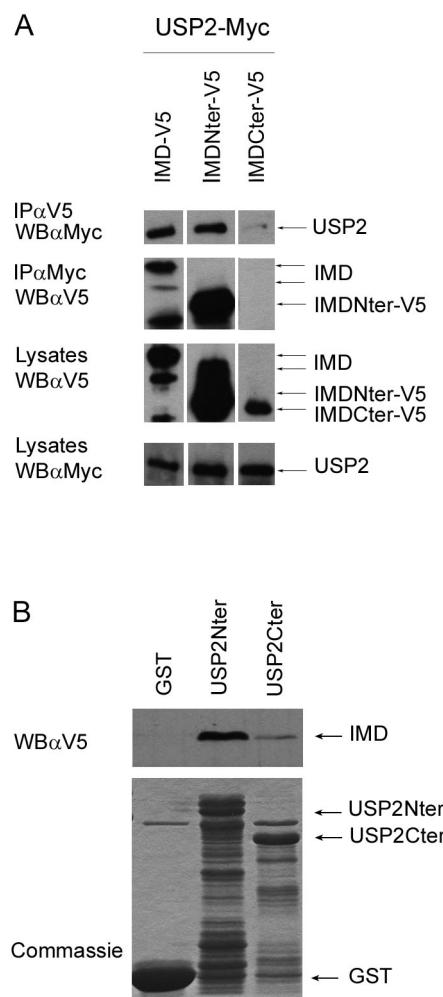


C

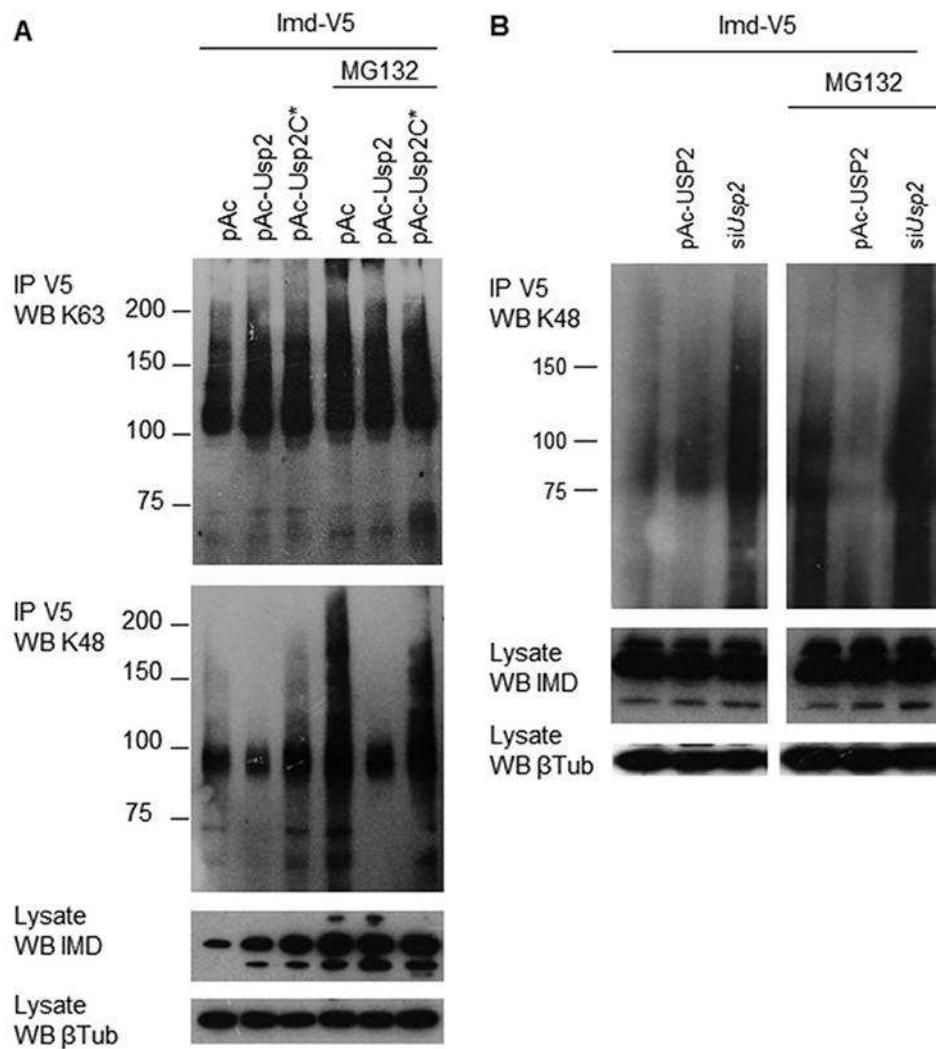
Figure 2. USP34 is a negative regulator of the Toll pathway (Engel *et al.*)



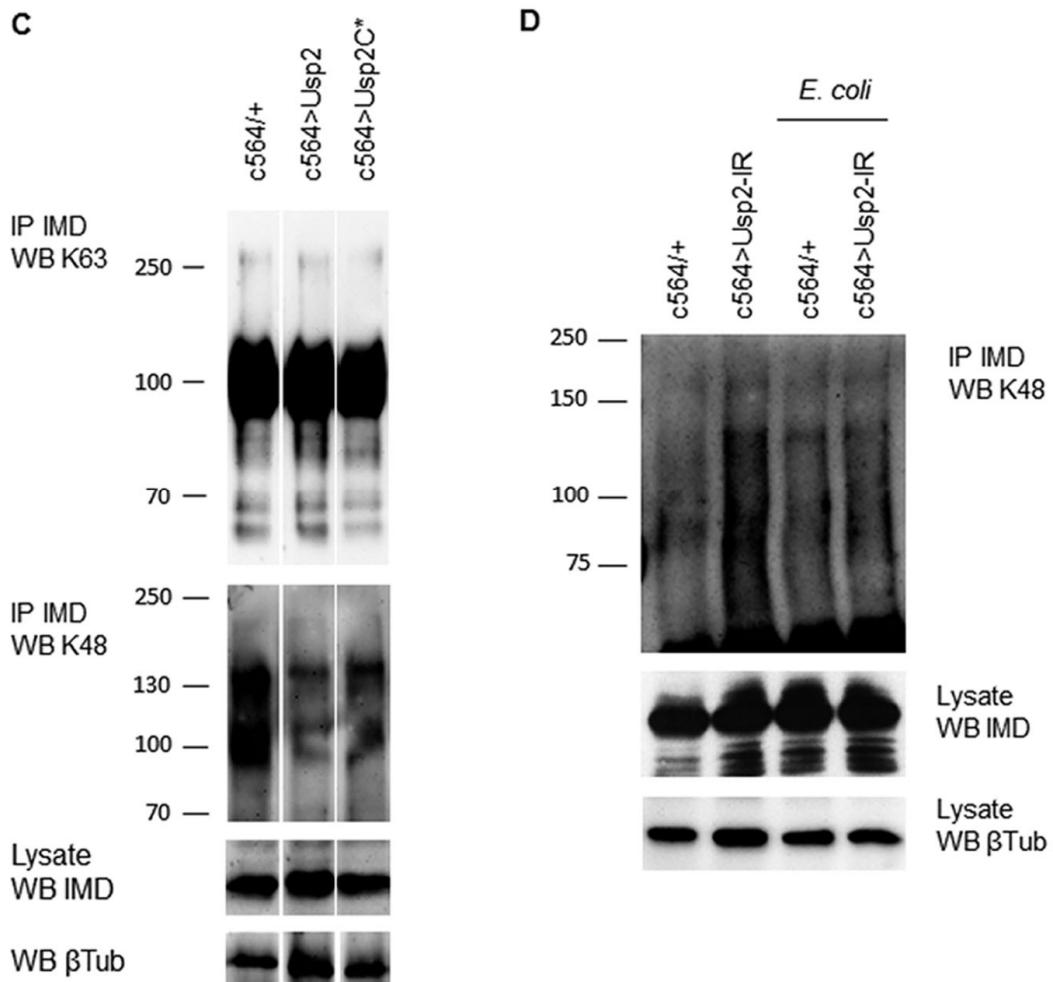
**Figure 3. USP2 and USP34 prevent constitutive activation of immune signalling *in vivo***  
 (Engel *et al.*)



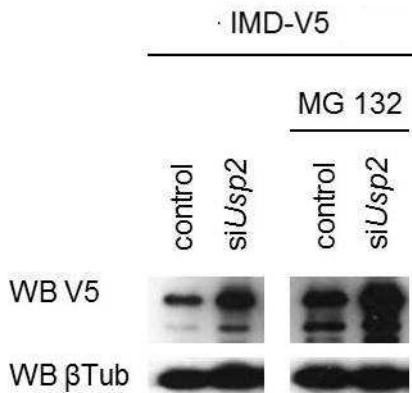
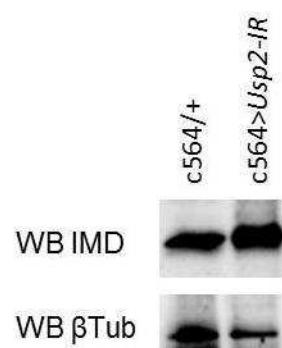
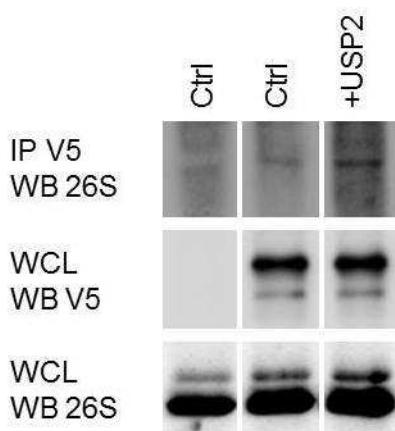
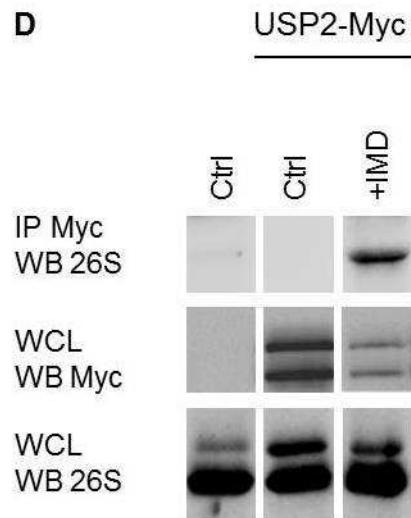
**Figure 4. USP2 interacts with IMD (Engel *et al.*)**

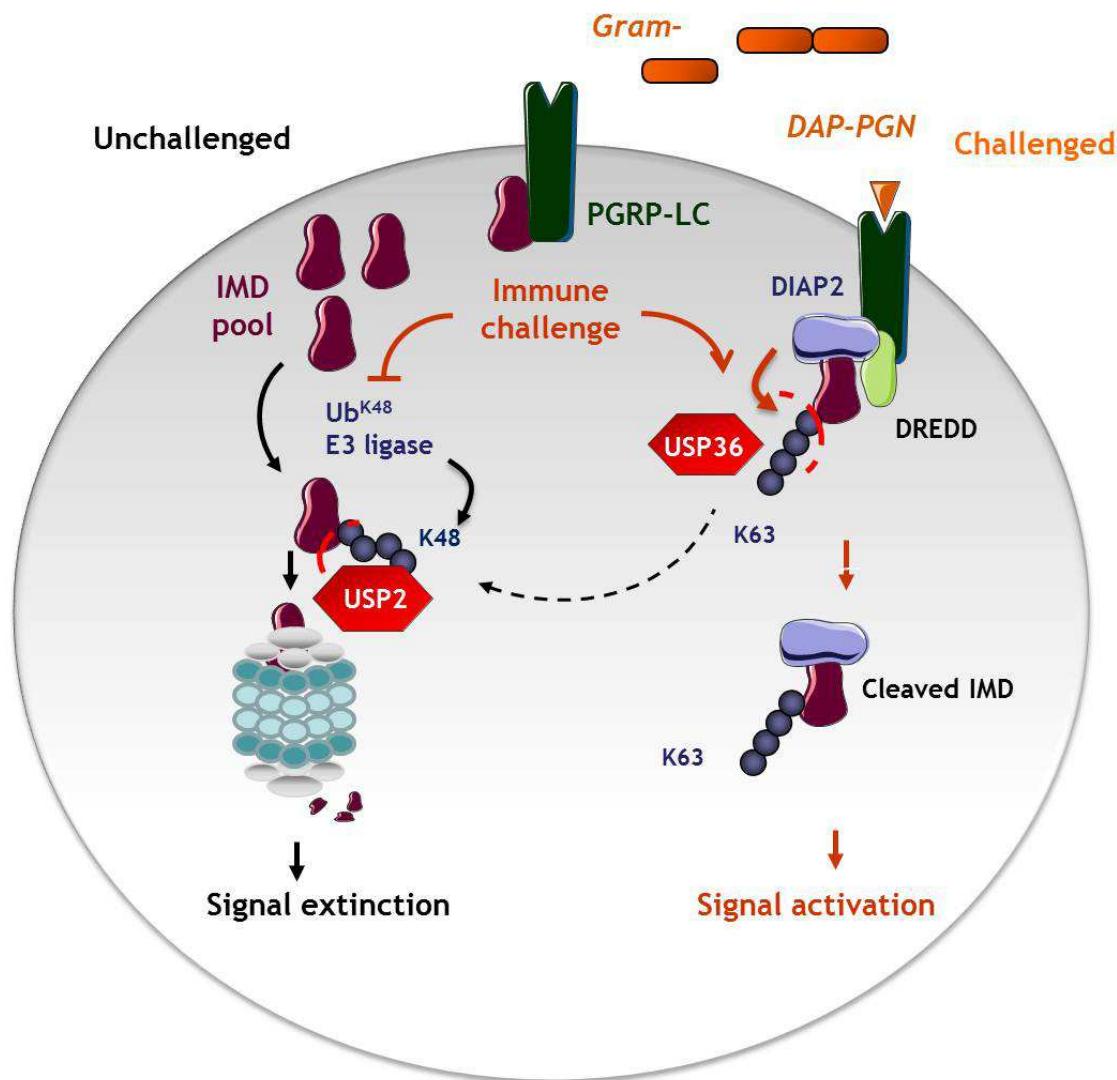


**Figure 5 A-B. USP2 hydrolyses IMD linked K48 ubiquitin chains**  
(Engel *et al.*)



**Figure 5 C-D. USP2 hydrolyses IMD linked K48 ubiquitin chains (Engel *et al.*)**

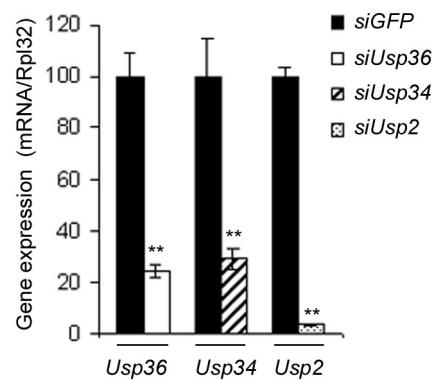
**A S2 cells lysate****B Total flies extracts****C IMD-V5****D****Figure 6. IMD proteasomal degradation requires USP2 (Engel *et al.*)**



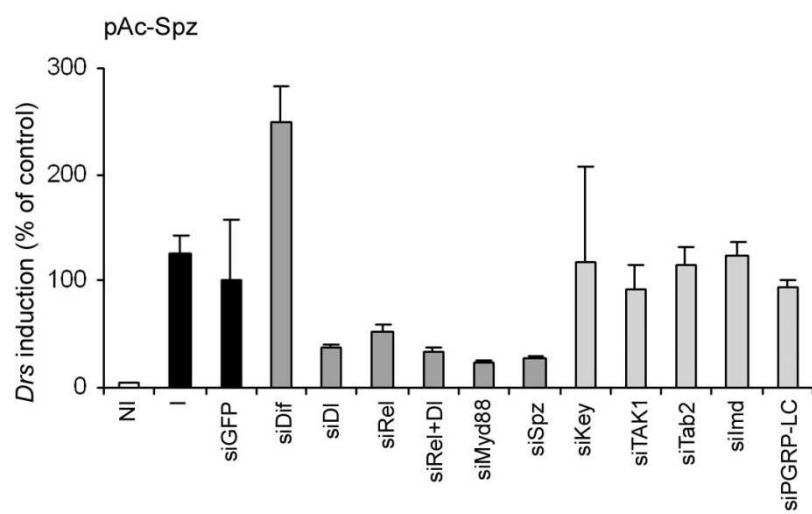
**Figure 7. USP2 and USP36 differentially control IMD ubiquitination and signalling**  
(Engel *et al.*)

Human closest homologs	Drosophila gene	CG number	Template	Forward and Reverse primer (without T7 sequences)	amplicon ID
USP1	Usp1	CG15817	LD22910	TACATAGCCAACCCGGATG CACAAATGCCTTCGAAGTCC	HFA14155
USP2	Usp2	CG14619	SD04280	CCAGCAGACCAAGGACACTC GAGCTGCTGCCGGATCCGCC	HFA20632
USP5	Usp5	CG12082	Genomic DNA	CCAGATTGGTGGCCTTGTG CTGGCATGCGCAATCTG	HFA08244
USP7/HAUSP	Usp7	CG1490	LD41613	GTCAGCGTCAACGGGAG CGACGACGGCAGTGTGTT	HFA18909
USP8	UbpY/Usp8	CG5798	Genomic DNA	CAGAACGATGAGCAGTTGA CCTCGGCTCGGTTTCATCG	HFA15876
USP10	Usp10	CG32479	LD28815	GGACGGATGCCCGAACGGAGG CTGGTGCCAGATCTGGGTC	HFA08282
USP12/USP46	Usp12-46	CG7023	RE52890	TACTGGCGAACCGGAATG TTCTGCGCCTCTGATAAA	HFA16175
USP14	Usp14	CG5384	Genomic DNA	TAGTTTCTCAAACGTCGG CTTGGTGAGCCGACTTCC	HFA02853
USP15/USP31	Usp15, Usp31	CG30421	GH27809	TACCGAAATGATCGACATGG CCAGCCCGAGTCCAAGTCCA	HFA04426
USP16/USP45	Usp16, Usp45	CG4165	LD34905	GTATTCGTTGGCTTCTTGT GGTCTGGCCGTTGGCTGT	HFA18352
USP30	Usp30	CG3016	LD41827	GTTCGGCGGCAGATTAGC CCCTCCAGTGCATGCTCAC	HFA18265
USP32	Usp32	CG8334	Genomic DNA	GCTGTTAATACCCAACCACT AGACCTCAAAGTAGATATAATTCT	HFA10979
USP33/USP20	Usp33, Usp20	CG8494	LD43649	TCGGCTGGAGGGCTTCGACA TCGGCCACCGAAAGTCCGGT	HFA07196
USP34	Usp34	CG5794	Genomic DNA	GCCATGCGACTGATCTCT CCGCACGATGGTGTATCTT	HFA15875
USP38/USP35	Usp38	CG8830	LD36231	CATCGATAGGTGGTGGAAAG TGCTTATCGAGTGCAATTCA	HFA07281
USP39	Usp39	CG7288	LD38070	CATCAAAGCGAACGACTAC GGTAGATCGCATGTGAGGT	HFA20032
CYLD	Cyld	CG5603	Genomic DNA	TCAATTATGCTGTGACATCAAG TOGGGGCAAGATTCTTATT	HFA02870
USP9	fat facets	CG1945	LD22582	TGACATCCTGAAGCAGAACT TAACCATGTATACGAACGGTC	HFA16942
USP22/USP51	Not	CG4166	LD43147	CGCAGGCTGAACGTGTTGGT TCTATTCCGGCTCCGGTTCG	HFA11378
USP36/USP42	Scny/dUsp36/ Usp36	CG5505	LD40339	GTGCGTTGACCAACGGACA AGTGGCGTTGACGGGAGT	HFA10510
USP47	Ubp64E/ E(var)3-64E	CG5486	LD26783	ACCAAGAGTGTACGTATCGC TGGGTGTTGCCATGTCT	HFA11313

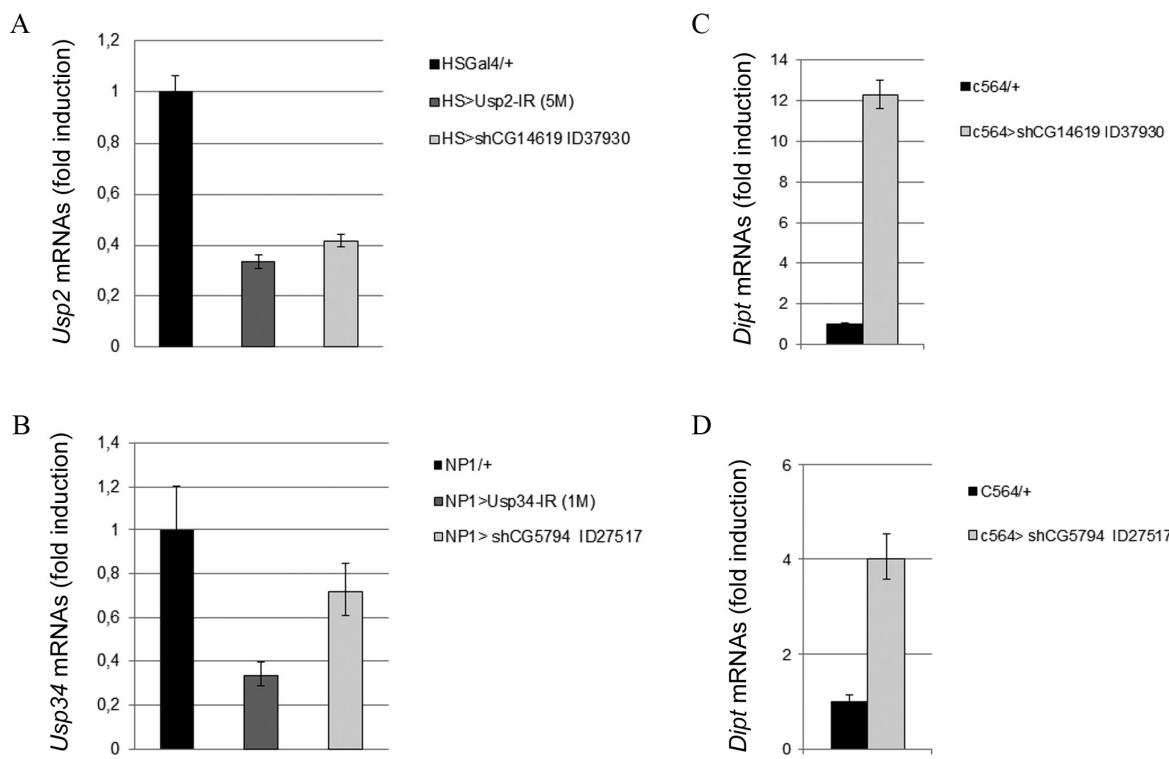
**Supplemental Table 1. Ubiquitin proteases screened on IMD and TOLL pathways**  
(Engel *et al.*)



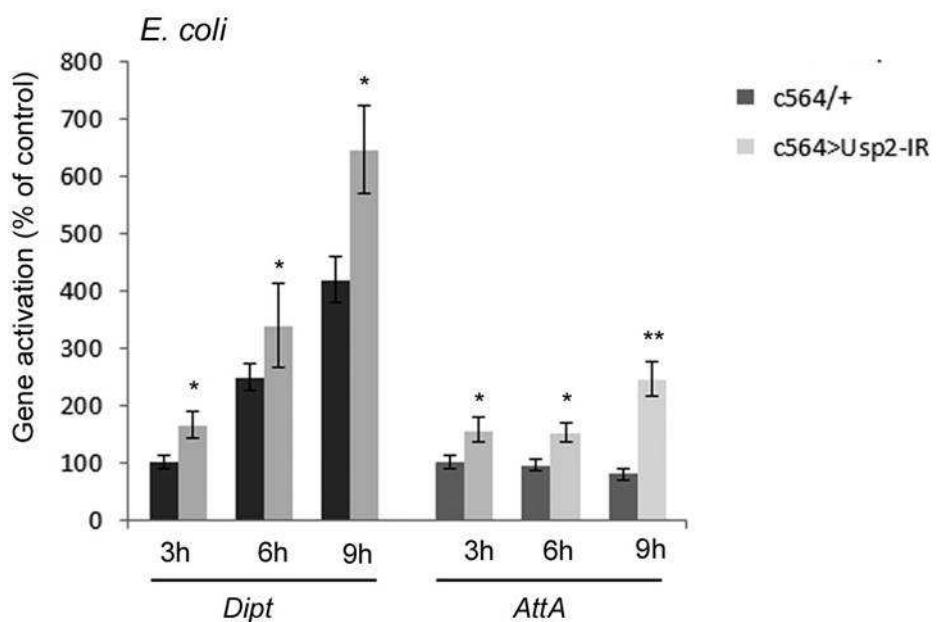
**Supplemental Figure S1. dUSP2, dUSP34 and dUSP36 are inactivated by dsRNA in S2 cells (Engel *et al.*)**



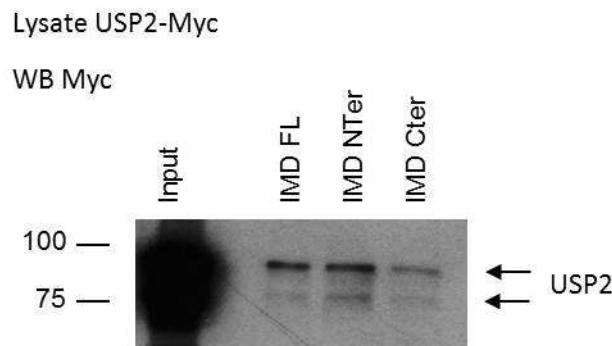
**Supplemental Figure S2. DL and Rel but not Dif mediate activation of Drs promoter in S2 cells (Engel *et al.*)**



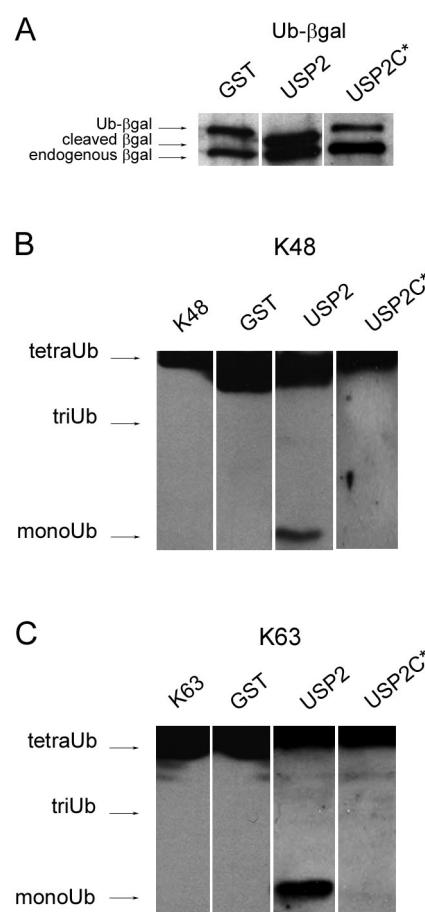
**Supplemental Figure S3. Second RNAi lines shows immune signal deregulation**  
(Engel *et al.*)



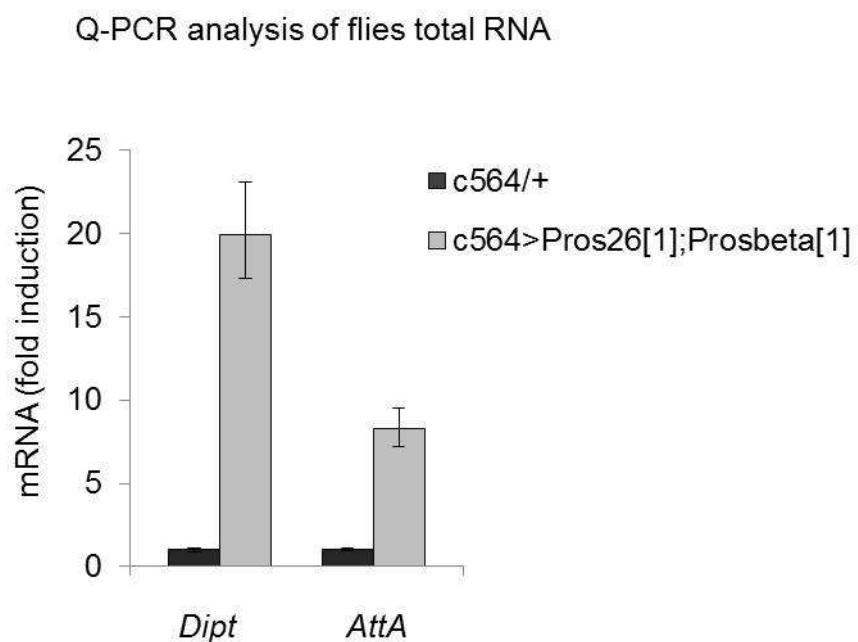
**Supplemental Figure S4. Silencing USP2 induces overactivation of the IMD pathway at several time points following infection (Engel *et al.*)**



**Supplemental Figure S5. USP2 preferentially interacts with IMD Nter part**  
(Engel *et al.*)



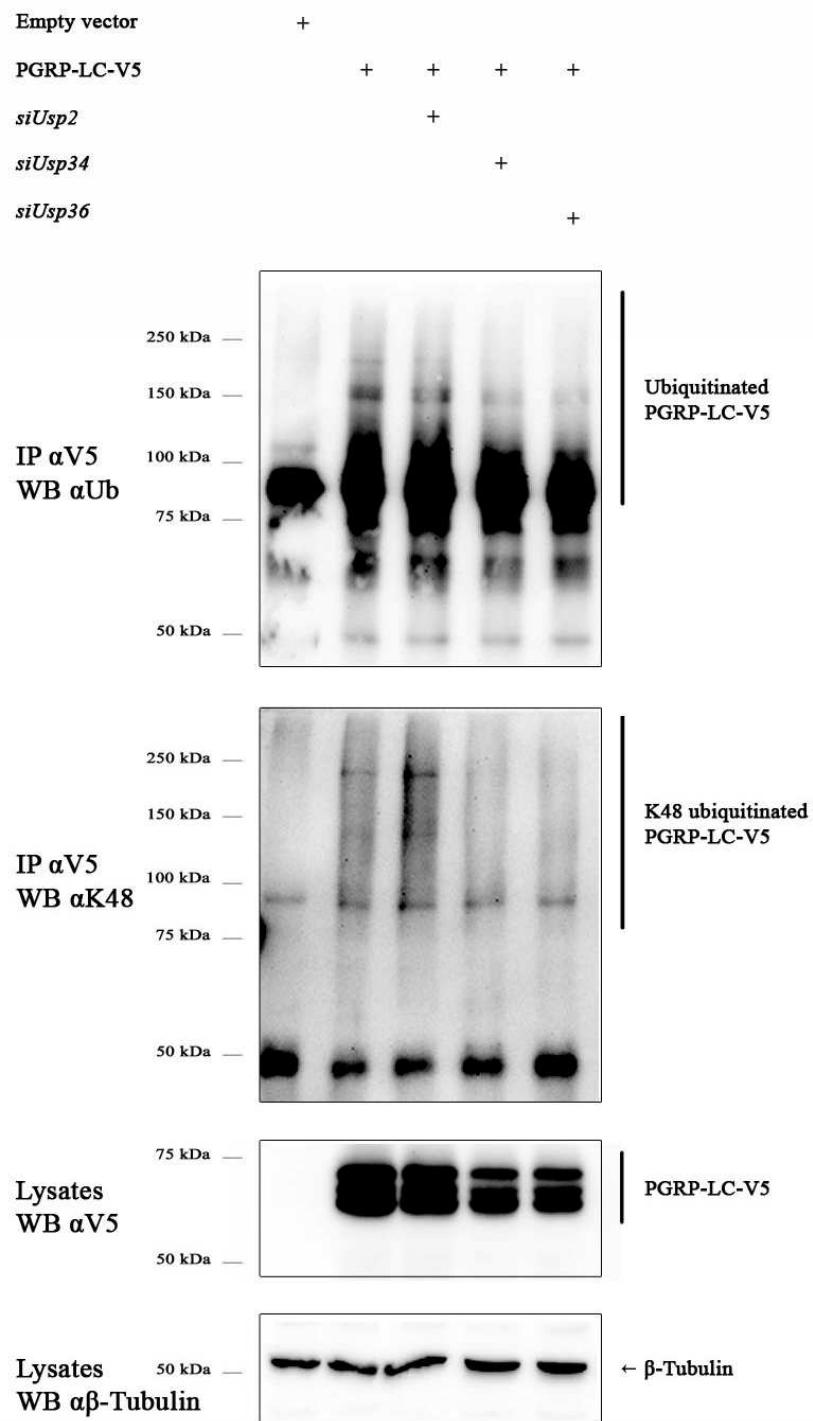
**Supplemental Figure S6. *Drosophila* USP2 is an active ubiquitin protease *in vitro***  
(Engel *et al.*)



**Supplemental Figure S7. Blocking the proteasome induces the IMD pathway**  
(Engel *et al.*)

**C. USP2 hydrolyse les chaînes de poly-ubiquitine K48 de PGRP-LC****1. Effet de l'extinction de *Usp2*, *Usp34* et *Usp36* sur l'ubiquitination de PGRP-LC**

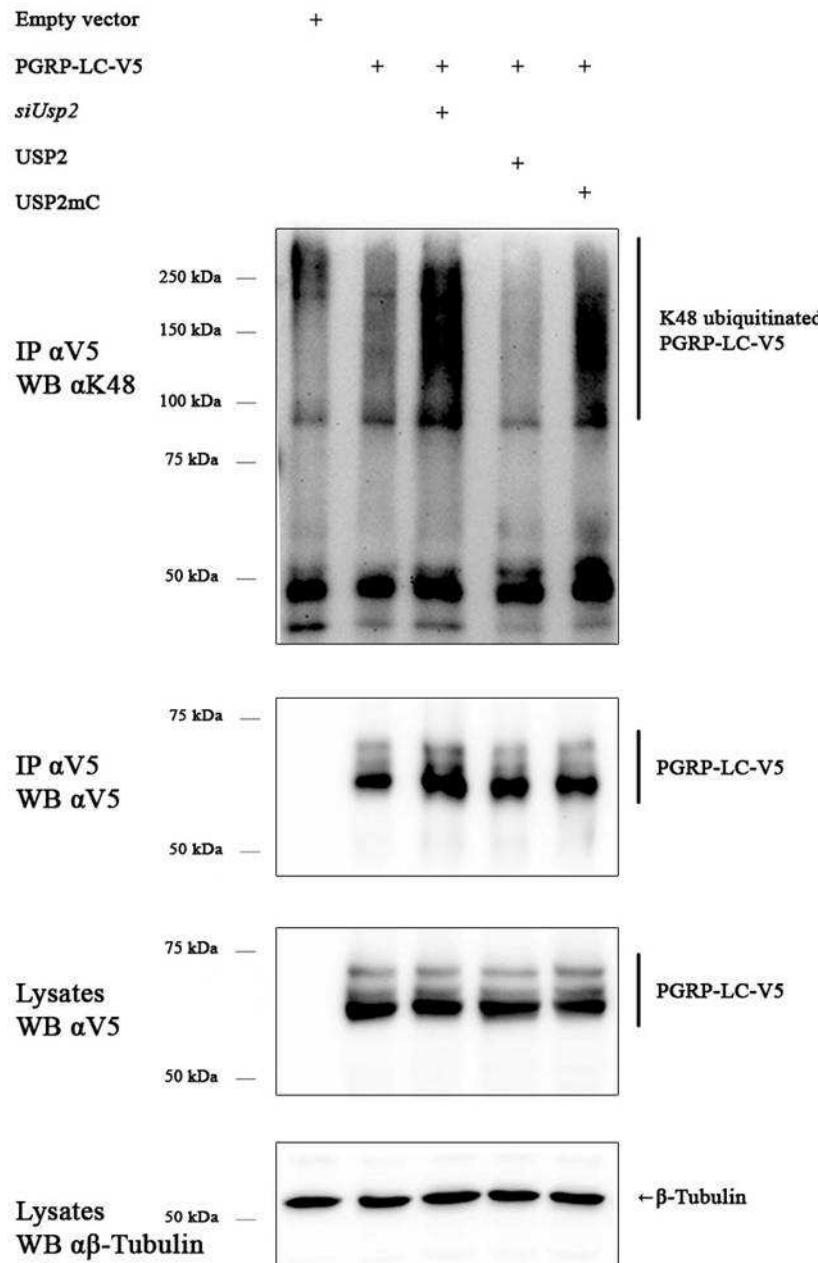
Le crible RNAi a identifié trois USPs régulant négativement la voie IMD : USP2, USP34 et USP36 (Engel *et al.*). C'est pourquoi, j'ai testé l'effet de l'extinction de chacune de ces trois USPs sur l'ubiquitination totale de PGRP-LC et, plus spécifiquement, sur sa poly-ubiquitination K48 (Fig. 24). Ainsi, j'ai observé que seule l'extinction de *Usp2* entraîne une augmentation des formes ubiquitinées de PGRP-LC, et, en particulier, des formes poly-ubiquitinées K48. Ce résultat suggère donc que USP2 agit sur les formes poly-ubiquitinées K48 de PGRP-LC. Nous avons déjà observé que USP2 agit spécifiquement sur la poly-ubiquitination K48, et non sur les K63, dans le cas de la protéine Imd. Ainsi, USP2 semble avoir une spécificité pour les chaînes de type K48 *in vivo*, bien qu'elle hydrolyse aussi bien les chaînes K48 et K63 *in vitro* (Engel *et al.*).



**Figure 24. Effet de l'extinction de *Usp2*, *Usp34* et *Usp36* sur l'ubiquitination de PGRP-LC.** Parmi les trois USPs candidates testées, seule l'extinction de *Usp2* entraîne une augmentation de l'ubiquitination de PGRP-LC. Cette augmentation est plus forte quand la membrane a été hybridée avec des anticorps spécifiques des chaînes de poly-ubiquitine K48, ce qui suggère que USP2 agit plutôt sur l'ubiquitination K48 du récepteur.

## 2. L'activité déubiquitinase de USP2 est nécessaire à l'hydrolyse des chaînes K48 de PGRP-LC

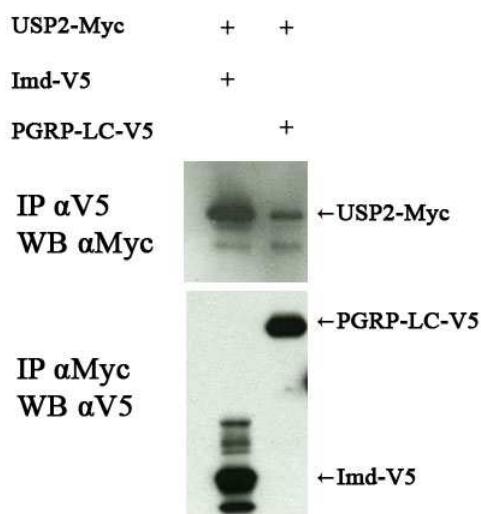
Pour mieux décrire le rôle de USP2 sur l'ubiquitination K48 de PGRP-LC, j'ai également testé la sur-expression de USP2 et du mutant catalytique USP2mC sur cette ubiquitination (Fig. 25). Dans un premier temps, l'augmentation de l'ubiquitination K48 de PGRP-LC en présence du *siUsp2* a été nettement confirmée. De plus, la sur-expression de USP2 diminue l'ubiquitination K48 associée à PGRP-LC, alors que le mutant catalytique USP2mC a plutôt un effet dominant négatif puisqu'il entraîne même par une augmentation de l'intensité du «smear» d'ubiquitination K48 comparé à celui des cellules transfectées par PGRP-LC-V5 seul. Donc, USP2 favorise, de façon dépendante de son activité catalytique, l'hydrolyse les chaînes K48 présentes sur PGRP-LC. L'hypothèse la plus plausible est que USP2 enlève directement ces chaînes d'ubiquitine sur le récepteur. Contrairement à la protéine Imd, la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC ne cible pas le récepteur pour la dégradation protéasomale, puisque ni la forme entière ni celles ubiquitinées K48 sont stabilisées en présence de MG132 (Fig. 21). En conséquence, nous supposons que la déubiquitination des chaînes K48 de PGRP-LC par USP2 contribue au trafic intracellulaire de PGRP-LC, soit vers la dégradation lysosomale, soit vers le recyclage membranaire, qui n'a cependant pas encore été mis en évidence.



**Figure 25. USP2 diminue la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC, de façon dépendante de son activité catalytique.** L'extinction de *Usp2* augmente la poly-ubiquitination K48 de PGRP-LC, alors que la sur-expression de USP2 diminue cette ubiquitination. En revanche, la sur-expression du mutant catalytique ne diminue pas l'ubiquitination K48 de PGRP-LC, mais, au contraire, elle est augmentée comparée aux cellules n'exprimant que PGRP-LC-V5. Cela provient sûrement d'un effet dominant négatif du mutant catalytique au détriment de USP2 endogène.

### 3. USP2 et PGRP-LC font partie d'un même complexe

Les résultats précédents indiquent que USP2 déubiquitine les chaînes K48 de PGRP-LC et, par ailleurs, nous savons que USP2 agit également sur Imd. Nous avons alors testé l'interaction de USP2 avec PGRP-LC (Fig. 26). Pour cela, des expériences de co-immunoprecipitation ont été menées à partir de cellules transfectées par USP2-Myc et un vecteur sur-exprimant Imd ou PGRP-LC avec une étiquette V5. Les protéines Imd-V5 et PGRP-LC-V5 co-immunoprecipitent toutes les deux la déubiquitinase USP2 (IP  $\alpha$ V5-WB  $\alpha$ Myc) et, réciproquement, l'immunoprecipitation de USP2-Myc emporte également les protéines Imd et PGRP-LC (IP  $\alpha$ Myc-WB  $\alpha$ V5). Donc, USP2 interagit, directement ou *via* un complexe protéique, avec chacune des deux protéines testées.

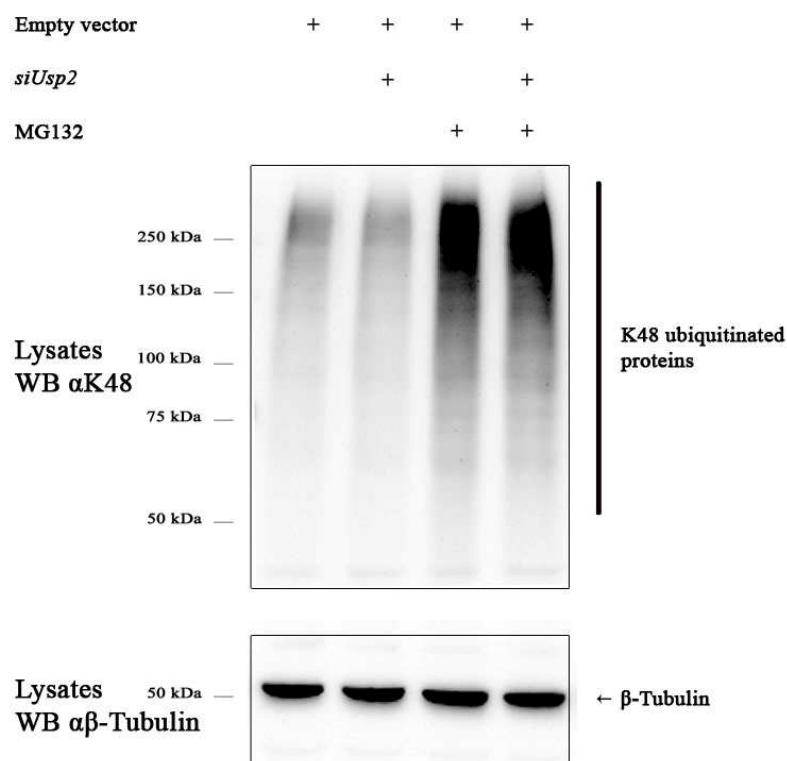


**Figure 26. USP2 interagit, directement ou à travers un complexe, avec les protéines Imd et PGRP-LC.** Les cellules S2 ont été transfectées par une construction USP2-Myc et deux éléments de la voie IMD fusionnés avec une étiquette V5. L'immunoprecipitation de Imd ou de PGRP-LC entraîne USP2. Réciproquement, l'immunoprecipitation de USP2 précipite aussi Imd et PGRP-LC. Ces résultats prouvent que USP2 interagit avec Imd et PGRP-LC. (Résultats de D. Thevenon)

### 4. La spécificité de la déubiquitinase USP2

Les effets de USP2 sur le récepteur membranaire PGRP-LC rappellent fortement ceux obtenus pour la protéine adaptatrice Imd (Engel *et al.*). De plus, nous avons observé que USP2 interagit avec au moins deux éléments de la voie IMD (Imd et PGRP-LC). Ces résultats soulèvent la question de la spécificité de USP2 et pourraient être cohérents avec un rôle beaucoup plus général de USP2. C'est pourquoi, j'ai regardé l'effet de l'extinction de *Usp2* sur la totalité des protéines poly-ubiquitinées par des chaînes K48 dans les lysats cellulaires (Fig. 27). Dans les cellules traitées ou non au MG132, l'extinction de cette déubiquitinase n'a

pas d'effet visible sur la totalité des protéines ubiquitinées K48. Ce même résultat a été observé en révélant avec un anticorps qui reconnaît toutes les protéines ubiquitinées ( $\alpha$ Ub FK2) (résultat non montré). Donc, USP2 ne semble pas avoir un rôle général, mais semble posséder plusieurs substrats appartenant à la réponse immunitaire.



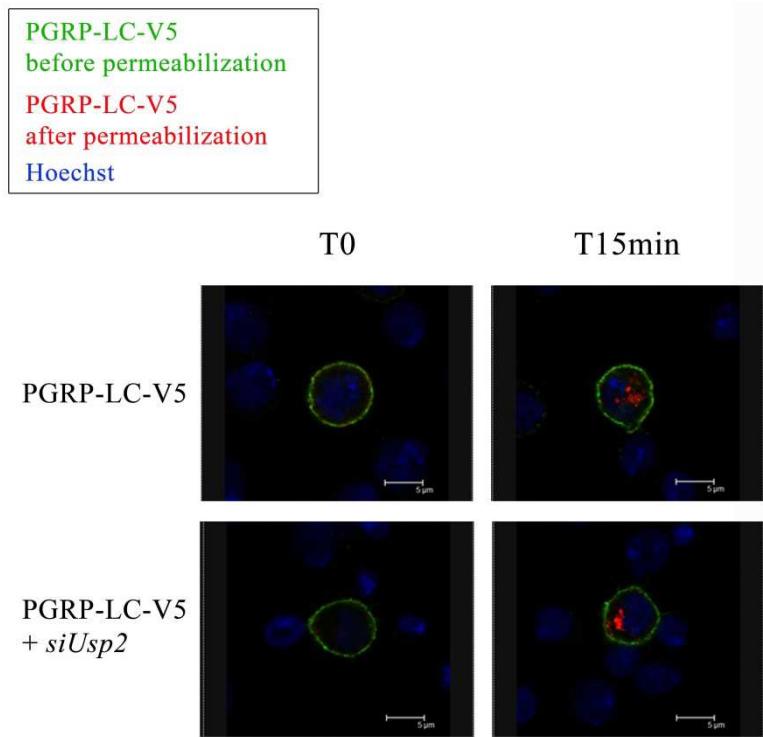
**Figure 27. Effet de USP2 sur la totalité des protéines poly-ubiquitinées par des chaînes K48.** En présence ou non de MG132, l'extinction de *Usp2* n'entraîne pas d'accumulation de la totalité des protéines ubiquitinées K48, comme cela a été observé pour les protéines Imd et PGRP-LC. Donc, USP2 n'est pas impliquée dans la déubiquitination générale des protéines poly-ubiquitinées par des chaînes K48.

##### 5. Effet de l'extinction de *Usp2* sur l'internalisation de PGRP-LC

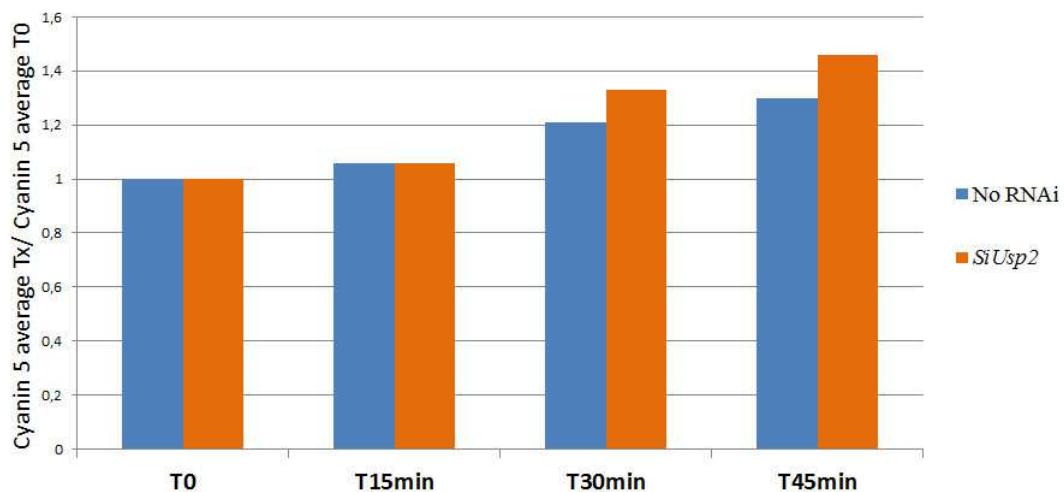
Puisque USP2 régule l'ubiquitination du récepteur PGRP-LC qui agit comme un signal d'internalisation (Viargues *et al.*), j'ai examiné l'effet de l'extinction de *Usp2* sur l'internalisation de PGRP-LC. Dans un premier temps, le protocole d'immunofluorescence mis au point a été utilisé pour suivre l'internalisation de PGRP-LC-V5, en présence ou non de *siUsp2* (Fig. 28a). Ainsi, il a été observé que le traitement par *siUsp2* semble augmenter un

peu la quantité de PGRP-LC internalisé, après avoir permis le processus endocytaire pendant 15 minutes à 25°C. Mais, à cause de l'hétérogénéité de la transfection des cellules S2, il est toujours très difficile de conclure sur l'effet d'un RNAi. C'est pourquoi, j'ai mesuré par cytométrie l'internalisation de PGRP-LC, avec ou sans *siUsp2* (Fig. 28b). Ce résultat est très préliminaire car l'expérience n'a été menée qu'une seule fois (d'où l'absence de barres d'erreurs) et les écarts observés sont assez faibles. En revanche, la fluorescence Cyanine 5 est moyennée sur un grand nombre de cellules (10000 cellules) correspondant à nos critères de sélection (fluorescence Alexa 488 comprise entre  $10^2$  et  $10^3$ , c'est-à-dire l'ensemble des cellules transfectées exprimant «de façon raisonnable» la construction PGRP-LC-V5). Ainsi, à partir de T30min, la présence du *siUsp2* augmente la quantité de PGRP-LC dans le cytoplasme. Ce résultat suggère que USP2 ralentit ou inhibe l'internalisation du récepteur membranaire ou bien, au contraire favorise son recrutement dans la voie des MVBs ou son possible recyclage à la membrane. Sous cette dernière hypothèse, l'augmentation de la quantité de PGRP-LC internalisé reflèterait une accumulation de PGRP-LC dans le cytoplasme. Une récente étude a montré que, dans les cellules humaines HeLa, l'isoforme USP2a localise au niveau des endosomes précoce et s'associe à l'EGFR, pour maintenir l'activation de la signalisation en aval d'EGFR (Liu et al., 2012). De plus, l'extinction de *Usp2a* entraîne une diminution de la quantité de l'EGFR à la membrane et la colocalisation de l'EGFR avec la protéine Rab11, présente dans les endosomes de recyclage, est augmentée par la sur-expression de USP2a. Donc, les auteurs proposent que USP2a déubiquitine EGFR au niveau des endosomes précoce pour favoriser son recyclage à la membrane plasmique, au détriment de son incorporation dans la voie endosomale aboutissant à la dégradation lysosomale. En revanche, dans cet article, les auteurs ne précisent pas quel type d'ubiquitination de EGFR est concernée par l'activité enzymatique de USP2, bien qu'ils montrent que USP2 hydrolyse aussi bien les chaînes K63 et K48 *in vitro*. Or, même s'il est principalement modifié par des chaînes de poly-ubiquitine K63, EGFR est aussi poly-ubiquitiné par des chaînes K11, K48 et K29, ainsi que par la multi-ubiquitination (Huang et al., 2006). Par analogie, nous pouvons spéculer que PGRP-LC poly-ubiquitiné par des chaînes K48 est sauvé de la dégradation lysosomale par USP2, au profit d'un recyclage membranaire.

a.

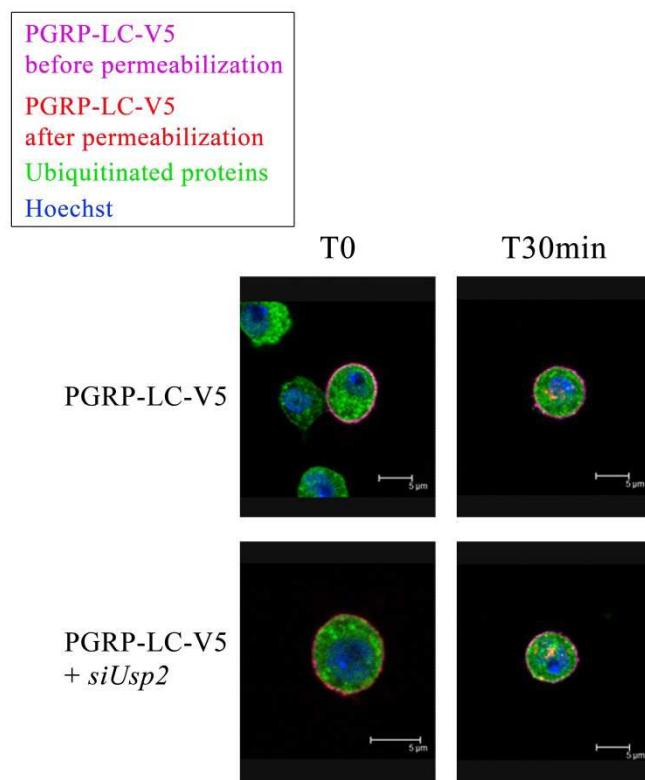


b.

Effect of *siUsp2* on the PGRP-LC internalization

**Figure 28. Effet de l'extinction de *Usp2* sur l'internalisation de PGRP-LC.** (a) L'observation au microscope confocal suggère que la présence du *siUsp2* augmente la quantité de PGRP-LC cytoplasmique, au temps T15min. Malheureusement, du fait de l'hétérogénéité des cellules transfectées, il est difficile de tirer des conclusions avec certitude. Echelle : 5 μm (b) Les résultats préliminaires de cytométrie présentés ici confirment que l'extinction de *Usp2* augmente la quantité de PGRP-LC cytoplasmique, mais à partir du temps T30min.

Par ailleurs, comme pour USP8, l'immunofluorescence de PGRP-LC a été effectuée en présence ou non du *siUsp2* et, dans laquelle la totalité des protéines ubiquitinées a également été marquée (Fig. 29). Contrairement au *siUsp8* qui provoque une accumulation de protéines ubiquitinées dans des structures particulières (Supp. Fig. 2, Viargues *et al.*), l'extinction de *Usp2* n'entraîne pas d'accumulation significative des protéines ubiquitinées dans le cytoplasme des cellules S2. Ce résultat confirme celui du western blot où il a été observé que la poly-ubiquitination K48 totale dans les lysats cellulaires n'était pas augmentée par le *siUsp2* (Fig. 27). Donc, USP2 n'agit pas sur la totalité des protéines ubiquitinées et ne semble pas être impliqué dans des processus essentiels à la physiologie cellulaire, comme par exemple déubiquitinier les protéines poly-ubiquitinées K48 avant leur entrée dans le protéasome. USP2 déubiquitineraient plutôt un ensemble de substrats, comme les composants de la voie IMD.



**Figure 29. L'extinction de *Usp2* n'entraîne pas d'accumulation significative des protéines ubiquitinées dans le cytoplasme.** L'internalisation de PGRP-LC a été suivie grâce au protocole d'immunofluorescence adapté et, par la même occasion, la totalité des protéines ubiquitinées dans la cellule a été marquée après la fixation et la perméabilisation des cellules. L'extinction de *Usp2*, contrairement à celle de *Usp8*, ne conduit pas à une accumulation de protéines ubiquitinées, ce qui est cohérent avec un rôle relativement spécifique de USP2 sur ses substrats. Echelle : 5 μm.

# Conclusion et Perspectives

---



## Conclusion et Perspectives

---

Le système immunitaire permet aux organismes de se défendre contre des agents pathogènes. La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les micro-organismes ; elle est activée par la reconnaissance de motifs du «non-soi» (PAMPs) par les récepteurs PRRs. Les PRRs vont induire des cascades de signalisation, parmi lesquelles les voies de type NF-κB contrôlent l'expression de gènes de la réponse immunitaires (e.g. cytokines pro-inflammatoires, peptides antimicrobiens, gènes de prolifération cellulaire...). Ces voies sont finement régulées, afin de permettre leur activation rapide en réponse à l'infection, puis le retour et le maintien de l'équilibre basal. Les modifications post-traductionnelles, comme l'ubiquitination, sont impliquées dans la régulation des voies de signalisation NF-κB, puisqu'elles permettent de réguler l'activité, la stabilité et la localisation subcellulaire des protéines. Nous avons décrypté certains mécanismes de régulation des voies NF-κB dépendant de l'ubiquitination, chez la drosophile.

Les travaux de l'équipe ont permis d'identifier trois USPs régulant négativement la voie IMD de la drosophile (USP2, USP34 et USP36) et une USP, USP34, régulant négativement la voie Toll (Engel *et al.*). Au cours de ma thèse, j'ai participé à la caractérisation de l'activité de USP2 sur la protéine Imd.

Nous avons observé que la protéine Imd est poly-ubiquitinée par des chaînes K48 qui la cible vers la dégradation protéasomale. USP2 favorise cette dégradation protéasomale de la protéine Imd. Notre hypothèse est que USP2 permet son envoi vers le protéasome et/ou favorise sa déubiquitination avant son entrée dans le protéasome. De façon intéressante, l'infection entraîne une perte des formes poly-ubiquitinées K48 de Imd (de façon indépendante de USP2) et stabilise la forme entière et la forme clivée de Imd, suggérant que la dégradation de Imd est bloquée pour permettre la signalisation. L'équipe avait précédemment montré que la protéine Imd est poly-ubiquitinée par des chaînes K63, nécessaires pour la transduction du signal, et que la déubiquitinase USP36 hydrolyse ces chaînes K63 (Thevenon *et al.*, 2009). Donc, les deux protéases USP2 et USP36 régulent différemment la stabilité et l'activité de Imd, mais toutes les deux contribuent à la régulation négative de la voie IMD.

Afin de rechercher d'autres niveaux de régulation par l'ubiquitine, une stratégie possible est d'identifier quels éléments de la voie IMD sont ubiquitinés. Dans cette optique, j'ai observé que le récepteur immunitaire PGRP-LC était ubiquitiné. J'ai démontré l'existence de

## Conclusion et Perspectives

---

chaînes K48 associées à PGRP-LC, ce qui n'exclut pas la poly-ubiquitination par d'autres types de chaînes ou la multi-ubiquitination. En outre, PGRP-LC est constitutivement dégradé par un mécanisme endocytaire, indépendamment du protéasome. La stimulation de la voie IMD par des PGN favorise l'endocytose et la dégradation de PGRP-LC. Par ailleurs, l'extinction de *Usp8* et des gènes codant pour les protéines endocytaires Hrs et Rab5 entraînent une accumulation des formes ubiquitinées de PGRP-LC et, plus spécifiquement, des formes poly-ubiquitinées par des chaînes K48. Nous pensons que cette accumulation est due au blocage de la dégradation lysosomale, ce qui suppose que les formes ubiquitinées de PGRP-LC sont spécifiquement recrutées vers la voie endosomale.

Comme observé pour la protéine Imd, la déubiquitinase USP2 favorise l'hydrolyse des chaînes de poly-ubiquitine K48 de PGRP-LC. En outre, USP2 interagit avec au moins deux membres de la voie IMD : PGRP-LC et Imd, directement ou au sein d'un complexe protéique. Pour autant, un rôle général sur la totalité des protéines ubiquitinées par des chaînes K48 a été exclu car l'extinction de *Usp2* ne modifie pas significativement le profil de l'ensemble des protéines ubiquitinées par ce type de chaîne dans la cellule.

Par la suite, j'ai développé un protocole d'immunofluorescence pour suivre l'internalisation des récepteurs PGRP-LC depuis la membrane plasmique vers le cytoplasme, par observation au microscope confocal. Grâce à cette technique, j'ai mis en évidence l'internalisation de PGRP-LC. Ensuite, j'ai remarqué que la stimulation par des PGN entraînait une réorganisation immédiate des récepteurs PGRP-LC sous la forme d'une structure en «collier de perles», reflétant probablement l'oligomérisation de PGRP-LC, et favorise l'internalisation de PGRP-LC. Comme l'observation par microscopie confocale n'a pas permis de conclure de façon quantitative sur l'effet d'ARNs interférents ciblant *Usp2*, *Usp8* ou des gènes codant pour des protéines endocytaires, le protocole a ensuite été adapté à l'analyse quantitative par cytométrie. Des expériences préliminaires suggèrent que l'extinction de *Usp8*, *Usp2* ou *Rab5* entraîne une accumulation de PGRP-LC dans le cytoplasme. Nous supposons que cette accumulation résulte d'un blocage de la voie endosomale conduisant aux lysosomes, ou, alternativement, dans le cas de USP2 et USP8, il est possible que ce soit le recyclage de PGRP-LC à la membrane qui soit bloqué.

### **A. Discussion et Perspectives**

#### **1. L'ubiquitination de PGRP-LC**

J'ai montré que le récepteur immunitaire PGRP-LC est ubiquitiné, au moins en partie par des chaînes K48, et dégradé par la voie lysosomale. A l'heure d'aujourd'hui, ce sont plutôt la multi-ubiquitination et la poly-ubiquitination K63 qui sont décrites comme des signaux d'endocytose. Plus récemment, il a été montré que la poly-ubiquitination K29 du récepteur Notch entraînait sa dégradation constitutive par les lysosomes (Chastagner et al., 2008). De plus, plusieurs exemples de récepteurs poly-ubiquitinés K48 existent dans la littérature. Par exemple, le récepteur Smo est à la fois multi-ubiquitiné, pour entrer dans la voie des endosomes, et poly-ubiquitiné K48 pour être envoyé vers le protéasome depuis les endosomes tardifs (Li et al., 2012). De plus, il a été observé que le récepteur IFNAR1 (IFN- $\alpha/\beta$  Receptor 1) est poly-ubiquitiné par des chaînes K48 et K63 et ces deux types de chaînes sont requises pour l'internalisation et la dégradation du récepteur (Kumar et al., 2007).

Par ailleurs, nous soupçonnons que PGRP-LC soit modifié par d'autres formes d'ubiquitination. J'ai testé la poly-ubiquitination K63 et il ne semble pas que PGRP-LC soit modifié par ce type de chaînes. Les anticorps spécifiques contre les autres chaînes de poly-ubiquitine n'étant pas disponibles, je n'ai pas pu mieux caractériser l'ubiquitination de PGRP-LC. Un des aspects les plus intéressants pour poursuivre ce travail serait d'identifier l'ubiquitine ligase E3 qui catalyse l'ubiquitination de PGRP-LC et de comprendre comment est régulée l'ubiquitination du récepteur immunitaire en réponse à l'infection. Une étude de spectrométrie de masse pourrait éventuellement permettre de déterminer quelle(s) ubiquitine ligase(s) E3 et quel(s) type de chaînes d'ubiquitine sont associés à PGRP-LC, dans différentes conditions (e.g. stimulation par des PGN).

#### **2. Caractérisation de l'endocytose de PGRP-LC**

Afin de comprendre plus facilement où se font les régulations de la voie IMD sur le récepteur, il est essentiel de bien maîtriser les étapes du trafic endocytaire de PGRP-LC. Pour répondre à cette question, on pourrait envisager d'effectuer le protocole

d'immunofluorescence, en co-marquant PGRP-LC et différentes protéines de la voie endocytaire (Rab5 ou Hrs pour les endosomes précoce, Rab7 pour les endosomes tardifs, le Lysotracker ou Lamp1 pour les lysosomes...). Par exemple, le co-marquage avec le Lysotracker ou la protéine Rab11, caractéristique des endosomes de recyclage, permettrait de savoir si l'internalisation de PGRP-LC conduit nécessairement à sa dégradation lysosomale ou s'il peut être recyclé à la membrane *via* les endosomes de recyclage. Par la suite, il sera alors possible d'observer quelle étape de l'endocytose de PGRP-LC est perturbée par l'ajout d'un RNAi spécifique. En outre, une observation de l'internalisation du récepteur sur des cinétiques plus longues (e.g jusqu'à 4 heures) permettrait de tester si la totalité de PGRP-LC internalisé est dégradée.

### 3. L'ubiquitination de PGRP-LC est-elle nécessaire à son internalisation ?

J'ai observé, d'une part, que PGRP-LC était ubiquitiné et, d'autre part, qu'il était internalisé. De plus, le blocage du processus endocytaire par extinction génique entraîne une accumulation de PGRP-LC ubiquitiné. En revanche, ces expériences ne prouvent pas de façon certaine que c'est l'ubiquitination de PGRP-LC qui déclenche son internalisation. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier la localisation d'un PGRP-LC qui ne peut plus être ubiquitiné : est-il localisé exclusivement à la membrane ou peut-il toujours internaliser ? Comme la drosophile ne possède qu'une seule enzyme «ubiquitin activating» E1 (Uba1), j'ai voulu tester l'extinction par RNAi de *Uba1* sur l'internalisation de PGRP-LC. Cependant, par western blot, j'ai observé que l'extinction de *Uba1* par deux RNAi différents ne diminue pas la quantité totale de protéines ubiquitinées dans les lysats cellulaire (résultats non montrés). Notre hypothèse est que le traitement par *siUba1* est très délétère pour les cellules et que nous sélectionnons les cellules qui arrivent à s'adapter, par exemple, *via* une stabilisation renforcée de la protéine Uba1. L'autre possibilité pour bloquer l'ubiquitination de PGRP-LC est de muter toutes ses lysines, du moins celles présentes dans le domaine intracellulaire. Stratégiquement, il faudrait commencer par muter les cinq lysines, qui sont très probablement ubiquitinées selon la prédition bioinformatique (Annexe 4, Fig. 34).

### 4. Rôle de USP2 dans le trafic endocytaire de PGRP-LC

USP8, Hrs et Rab5 sont des protéines impliquées dans le processus endocytaire. Donc, l'accumulation de PGRP-LC ubiquitiné causée par leur inhibition peut s'expliquer par le blocage du trafic endocytaire. En revanche, USP2 n'a pas de rôle général connu dans l'endocytose, mais j'ai pourtant observé que son extinction génique conduisait à une accumulation des formes poly-ubiquitinées K48 de PGRP-LC. D'après les expériences préliminaires de cytométrie, il semblerait que l'extinction de *Usp2* augmente la quantité de PGRP-LC internalisé dans le cytoplasme. Ce résultat peut être la conséquence soit d'un blocage de l'incorporation de PGRP-LC dans la voie endosomale, soit d'une diminution de son recyclage à la membrane. Or, l'isoforme USP2a déubiquitine EGFR au niveau des endosomes précoce pour favoriser son recyclage à la membrane (Liu et al., 2012). Donc, il est tentant de spéculer que USP2 déubiquitine également PGRP-LC pour le sauver de la dégradation lysosomale et permettre sa réintégration à la membrane plasmique. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait regarder si la colocalisation entre PGRP-LC et le marqueur des endosomes de recyclage Rab11 est augmentée en présence de USP2. Une autre stratégie est de regarder par cytométrie la variation de la quantité de PGRP-LC à la membrane dans le temps, en bloquant la synthèse protéique par le cycloheximide. De cette façon, on s'affranchit du PGRP-LC nouvellement synthétisé et les variations de la quantité du récepteur à la membrane proviennent de son internalisation et/ou de son recyclage. Enfin, on pourra regarder si ces variations sont modifiées par la sur-expression ou l'extinction génique de USP2.

### 5. L'endocytose est-elle nécessaire à la signalisation de la voie IMD ?

La question essentielle soulevée par cette étude concerne le lien entre l'endocytose de PGRP-LC et la signalisation de la voie IMD. En effet, l'internalisation des récepteurs membranaires a longtemps été considérée comme un moyen d'arrêter la signalisation en permettant leur dégradation. Mais, de plus en plus d'informations suggèrent que beaucoup de récepteurs sont actifs pendant ou après leur internalisation et que la signalisation continue le long de la voie endocytaire. Par exemple, l'endocytose du récepteur Toll de la drosophile est strictement nécessaire à la signalisation. Dans certains cas, comme celui du TNFR-1 des mammifères, l'internalisation intracellulaire assure la sélectivité des signaux activés. Donc,

## Conclusion et Perspectives

---

l'endocytose contrôle la signalisation cellulaire, en couplant et intégrant différentes cascades de signalisation, à la surface de vésicules endocytaires, afin de contrôler la qualité, l'intensité, la distribution et la durée de la signalisation.

Dans un premier temps, nous avons observé, à plusieurs reprises, que l'extinction de *Usp8* n'induit pas une activation constitutive ou une sur-activation de la voie IMD. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que, lorsque *Usp8* est éteint, PGRP-LC peut être accumulé sous une forme ubiquitinée inactive qui n'est plus capable de signaler ou bien que ce récepteur est déjà engagé dans les vésicules intraluminales : à cette étape, la transduction du signal par PGRP-LC ne peut plus avoir lieu. En outre, j'ai également observé, par le test luciférase, l'effet de l'extinction des gènes codant pour les protéines endocytaire *Hrs* et *Rab5* et, malheureusement, aucun résultat significatif et reproductif n'a été observé. Cela provient sûrement du fait que la présence des *siHrs* et *siRab5* est très délétère pour les cellules S2, comme il a été observé lors des expériences de cytométrie. Par la suite, il serait intéressant de mesurer par RT-qPCR l'activation de la voie IMD, c'est-à-dire l'expression de *l'attacine* et de la *diptéricine*, dans des mouches transgéniques, où *Hrs* ou *Rab5* ont été éteints. Cette expérience devra être faite à partir de mouches infectées par piqûre ou non-infectées. De plus, il est possible que les étapes précoces de l'endocytose soient nécessaires à la transduction du signal de PGRP-LC, alors qu'une fois engagé dans les endosomes précoces, PGRP-LC est destiné à être dégradé pour réguler négativement la voie IMD. C'est pourquoi, il faudrait également tester l'effet du dynasore, un inhibiteur de la dynamine intervenant précocement dans l'endocytose (détachement de la vésicule enrobée de clathrine de la membrane cellulaire), sur l'activation de la voie IMD.

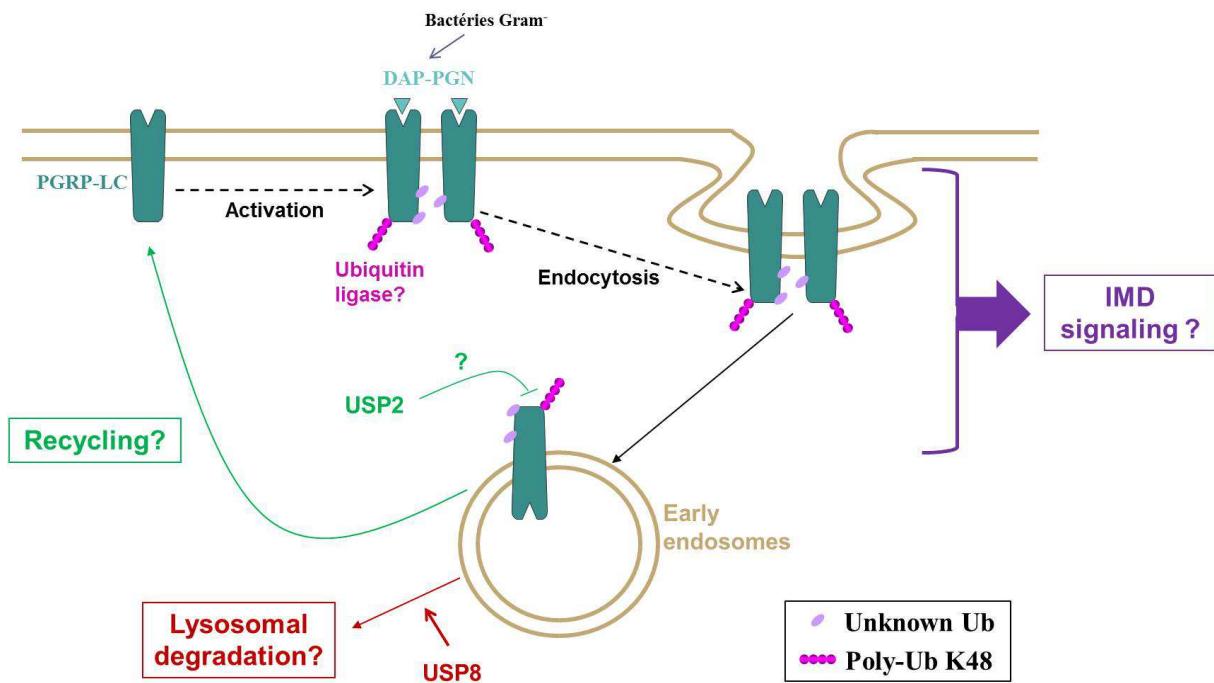
Par ailleurs, la protéine PIMS (PGRP-LC-interacting inhibitor of IMD Signaling), ou aussi nommée Pirk ou Rudra, est un régulateur négatif de la voie IMD. L'expression du gène *pims* est induite en réponse à l'infection par des bactéries à Gram négatif et, dans l'intestin, son expression basale repose sur la présence de la flore commensale, permettant d'éviter une activation inappropriée de la voie. De plus, la protéine PIMS interagit avec PGRP-LC, PGRP-LE et Imd (Aggarwal et al., 2008; Kleino et al., 2008; Lhocine et al., 2008). De façon intéressante, il a été observé que PIMS change la localisation subcellulaire de PGRP-LC (Lhocine et al., 2008). En effet, la présence de PIMS entraîne une réorganisation de PGRP-LC de la membrane vers des structures organisées du cytoplasme. Donc, il est probable que PIMS

favorise l'internalisation de PGRP-LC, et, pourquoi pas, sa dégradation dans les lysosomes, ce qui serait cohérent avec son rôle de régulateur négatif de la voie IMD.

### **B. Conclusion générale**

La régulation négative de la réponse immunitaire est cruciale, afin d'éviter une réponse excessive et maintenue dans le temps. En effet, de nombreuses pathologies, comme les maladies auto-immunes et inflammatoires, sont associées à une dérégulation du système immunitaire. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes de régulation négatifs impliquant l'ubiquitine dans les voies immunitaires IMD et Toll de la drosophile. Dans un premier temps, nous avons identifié trois déubiquitinases (USP2, USP34 et USP36) régulant négativement la voie IMD et une seule USP, USP34, régulant négativement la voie Toll. De plus, nous avons montré que la déubiquitinase USP2 favorise la dégradation protéasomale de la protéine Imd poly-ubiquitinée par des chaînes K48, alors que USP36 hydrolyse les chaînes K63 nécessaires à l'activation de la protéine Imd. Par ailleurs, j'ai observé que le récepteur immunitaire PGRP-LC était ubiquitiné, au moins en partie par des chaînes K48, et qu'il était endocyté et probablement dégradé dans les lysosomes. De plus, la déubiquitinase USP2 favorise l'hydrolyse des formes poly-ubiquitinées K48 de PGRP-LC. Ces résultats nous amènent à proposer le modèle suivant pour l'endocytose de PGRP-LC (Fig. 30). La reconnaissance des DAP-PGN par le récepteur membranaire PGRP-LC entraîne son oligomérisation et son ubiquitination, par des chaînes de poly-ubiquitine K48 et, probablement, par d'autres types de chaînes. L'ubiquitine ligase catalysant l'ubiquitination du récepteur reste à être identifiée. L'ubiquitination de PGRP-LC déclenche son internalisation. Au niveau des endosomes précoce, PGRP-LC peut intégrer la voie de dégradation lysosomale ou, au contraire, être recyclé à la membrane plasmique. Comme cela a été montré pour EGFR, il est tentant de spéculer que USP2 déubiquitine PGRP-LC au niveau des endosomes précoce pour favoriser son recyclage au profit de sa dégradation lysosomale. Cette hypothèse serait cohérente avec les résultats préliminaires de cytométrie obtenus en présence de *siUsp2*. Pour finir, bien que l'endocytose ait longtemps été observée comme un moyen de dégrader les récepteurs membranaires pour limiter la signalisation, il est maintenant évident qu'un récepteur peut induire la signalisation tout le long de son internalisation. Dans certains cas, comme ceux des récepteurs TLR-4 et TNF-R1, l'endocytose permet la sélectivité des voies de signalisation et les endosomes sont donc de fabuleuses plateformes de

signalisation. A la suite de cette thèse, il serait très intéressant de comprendre le rôle de l'internalisation de PGRP-LC dans la voie de signalisation IMD : depuis quel compartiment cellulaire et à quel moment se fait la transduction du signal ?



**Figure 30. Modèle d'endocytose du récepteur immunitaire PGRP-LC.** La reconnaissance de DAP-PGN par le récepteur PGRP-LC entraîne son oligomérisation et son ubiquitination, au moins en partie par des chaînes de poly-ubiquitine K48, par une ubiquitine ligase E3 inconnue. L'ubiquitination de PGRP-LC déclenche son endocytose et sa dégradation lysosomale, impliquant la déubiquitinase USP8. Il est possible que USP2 déubiquitime PGRP-LC au niveau des endosomes précoce, afin de favoriser son recyclage à la membrane cellulaire, au détriment de sa dégradation par les lysosomes. La transduction du signal peut se faire depuis la membrane cellulaire, mais aussi depuis les compartiments intracellulaires.

# Références bibliographiques

---



**Références bibliographiques**

Aggarwal, K., F. Rus, C. Vriesema-Magnuson, D. Erturk-Hasdemir, N. Paquette, and N. Silverman. 2008. Rudra interrupts receptor signaling complexes to negatively regulate the IMD pathway. *PLoS pathogens*. 4:e1000120.

Aggarwal, K., and N. Silverman. 2008. Positive and negative regulation of the Drosophila immune response. *BMB reports*. 41:267-277.

Aggrawal, K., and N. Silverman. 2007. Peptidoglycan recognition in Drosophila. *Biochemical Society transactions*. 35:1496-1500.

Agromayor, M., and J. Martin-Serrano. 2006. Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo. *The Journal of biological chemistry*. 281:23083-23091.

Aguilar, J.C., and E.G. Rodriguez. 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 25:3752-3762.

Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783-801.

Al Olayan, A., H. Al Hussaini, and A.R. Jazieh. 2012. The roles of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors in the management of lung cancer. *Journal of infection and public health*. 5 Suppl 1:S50-60.

Ali, N., L. Zhang, S. Taylor, A. Mironov, S. Urbe, and P. Woodman. 2013. Recruitment of UBPY and ESCRT exchange drive HD-PTP-dependent sorting of EGFR to the MVB. *Current biology : CB*. 23:453-461.

Alwan, H.A., and J.E. van Leeuwen. 2007. UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. *The Journal of biological chemistry*. 282:1658-1669.

Amerik, A.Y., and M. Hochstrasser. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et biophysica acta*. 1695:189-207.

Amerik, A.Y., J. Nowak, S. Swaminathan, and M. Hochstrasser. 2000. The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Molecular biology of the cell*. 11:3365-3380.

Aparicio, R., C. Neyen, B. Lemaitre, and A. Busturia. 2013. dRYBP contributes to the negative regulation of the Drosophila Imd pathway. *Plos one*. 8:e62052.

Avvakumov, G.V., J.R. Walker, S. Xue, P.J. Finerty, Jr., F. Mackenzie, E.M. Newman, and S. Dhe-Paganon. 2006. Amino-terminal dimerization, NRDPI-rhodanese interaction, and inhibited catalytic domain conformation of the ubiquitin-specific protease 8 (USP8). *The Journal of biological chemistry*. 281:38061-38070.

Bache, K.G., T. Slagsvold, and H. Stenmark. 2004. Defective downregulation of receptor tyrosine kinases in cancer. *The EMBO journal*. 23:2707-2712.

Balakirev, M.Y., S.O. Tcherniuk, M. Jaquinod, and J. Chroboczek. 2003. Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO reports*. 4:517-522.

Basbous, N., F. Coste, P. Leone, R. Vincentelli, J. Royet, C. Kellenberger, and A. Roussel. 2011. The Drosophila peptidoglycan-recognition protein LF interacts with peptidoglycan-recognition protein LC to downregulate the Imd pathway. *EMBO reports*. 12:327-333.

Belvin, M.P., and K.V. Anderson. 1996. A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annual review of cell and developmental biology*. 12:393-416.

## Références bibliographiques

---

Ben-Saadon, R., D. Zaaroor, T. Ziv, and A. Ciechanover. 2006. The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. *Molecular cell*. 24:701-711.

Bergeret, E., J. Perrin, M. Williams, D. Grunwald, E. Engel, D. Thevenon, E. Taillebourg, F. Bruckert, P. Cosson, and M.O. Fauvarque. 2008. TM9SF4 is required for Drosophila cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis. *Journal of cell science*. 121:3325-3334.

Bergink, S., and S. Jentsch. 2009. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature*. 458:461-467.

Berlin, I., K.M. Higginbotham, R.S. Dise, M.I. Sierra, and P.D. Nash. 2010a. The deubiquitinating enzyme USP8 promotes trafficking and degradation of the chemokine receptor 4 at the sorting endosome. *The Journal of biological chemistry*. 285:37895-37908.

Berlin, I., H. Schwartz, and P.D. Nash. 2010b. Regulation of epidermal growth factor receptor ubiquitination and trafficking by the USP8.STAM complex. *The Journal of biological chemistry*. 285:34909-34921.

Berndt, C., D. Bech-Otschir, W. Dubiel, and M. Seeger. 2002. Ubiquitin system: JAMMing in the name of the lid. *Current biology : CB*. 12:R815-817.

Bertrand, M.J., S. Milutinovic, K.M. Dickson, W.C. Ho, A. Boudreault, J. Durkin, J.W. Gillard, J.B. Jaquith, S.J. Morris, and P.A. Barker. 2008. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Molecular cell*. 30:689-700.

Bhaskar, V., M. Smith, and A.J. Courey. 2002. Conjugation of Smt3 to dorsal may potentiate the Drosophila immune response. *Molecular and cellular biology*. 22:492-504.

Bhaskar, V., S.A. Valentine, and A.J. Courey. 2000. A functional interaction between dorsal and components of the Smt3 conjugation machinery. *The Journal of biological chemistry*. 275:4033-4040.

Bhowmick, P., R. Pancsa, M. Guharoy, and P. Tompa. 2013. Functional diversity and structural disorder in the human ubiquitination pathway. *PLoS one*. 8:e65443.

Bidla, G., M. Lindgren, U. Theopold, and M.S. Dushay. 2005. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in Drosophila larvae. *Developmental and comparative immunology*. 29:669-679.

Bischoff, V., C. Vignal, I.G. Boneca, T. Michel, J.A. Hoffmann, and J. Royet. 2004. Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nature immunology*. 5:1175-1180.

Bischoff, V., C. Vignal, B. Duvic, I.G. Boneca, J.A. Hoffmann, and J. Royet. 2006. Downregulation of the Drosophila immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS pathogens*. 2:e14.

Boehm, T. 2012. Evolution of vertebrate immunity. *Current biology : CB*. 22:R722-732.

Boneca, I.G. 2009. Mammalian PGRPs in the spotlight. *Cell host & microbe*. 5:109-111.

Bonifacino, J.S., and R. Rojas. 2006. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7:568-579.

Bonifacino, J.S., and L.M. Traub. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annual review of biochemistry*. 72:395-447.

Bourgeois, C., O. Majer, I.E. Frohner, L. Tierney, and K. Kuchler. 2010. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. *Current opinion in microbiology*. 13:401-408.

## Références bibliographiques

---

Boutros, M., H. Agaisse, and N. Perrimon. 2002. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Developmental cell*. 3:711-722.

Bowers, K., J. Lottridge, S.B. Helliwell, L.M. Goldthwaite, J.P. Luzio, and T.H. Stevens. 2004. Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*. 5:194-210.

Brand, A.H., and N. Perrimon. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118:401-415.

Brou, C. 2009. Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. *Experimental cell research*. 315:1549-1555.

Brown, J., H. Wang, G.N. Hajishengallis, and M. Martin. 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of dental research*. 90:417-427.

Buchon, N., M. Poidevin, H.M. Kwon, A. Guillou, V. Sottas, B.L. Lee, and B. Lemaitre. 2009. A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the *Drosophila* Toll pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:12442-12447.

Burnett, B., F. Li, and R.N. Pittman. 2003. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Human molecular genetics*. 12:3195-3205.

Cadavid, A.L., A. Ginzel, and J.A. Fischer. 2000. The function of the *Drosophila* fat facets deubiquitinating enzyme in limiting photoreceptor cell number is intimately associated with endocytosis. *Development*. 127:1727-1736.

Carthew, R.W., and C. Xu. 2000. Endocytosis: why not wait to deubiquitinate? In *Current Biology*. Vol. 10. R532-534.

Cerenius, L., S. Kawabata, B.L. Lee, M. Nonaka, and K. Soderhall. 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends in biochemical sciences*. 35:575-583.

Cerenius, L., and K. Soderhall. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological reviews*. 198:116-126.

Chang, C.I., Y. Chelliah, D. Borek, D. Mengin-Lecreulx, and J. Deisenhofer. 2006. Structure of tracheal cytotoxin in complex with a heterodimeric pattern-recognition receptor. *Science*. 311:1761-1764.

Chang, C.I., S. Pili-Floury, M. Herve, C. Parquet, Y. Chelliah, B. Lemaitre, D. Mengin-Lecreulx, and J. Deisenhofer. 2004. A *Drosophila* pattern recognition receptor contains a peptidoglycan docking groove and unusual L,D-carboxypeptidase activity. *PLoS biology*. 2:E277.

Charroux, B., T. Rival, K. Narbonne-Reveau, and J. Royet. 2009. Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 11:631-636.

Chastagner, P., A. Israel, and C. Brou. 2008. AIP4/Itch regulates Notch receptor degradation in the absence of ligand. *PloS one*. 3:e2735.

Chen, Y., and G. Struhl. 1996. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell*. 87:553-563.

Chen, Z., J. Hagler, V.J. Palombella, F. Melandri, D. Scherer, D. Ballard, and T. Maniatis. 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes & development*. 9:1586-1597.

## Références bibliographiques

---

Chen, Z.J. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nature cell biology*. 7:758-765.

Chiu, H., B.C. Ring, R.P. Sorrentino, M. Kalamarz, D. Garza, and S. Govind. 2005. dUbc9 negatively regulates the Toll-NF-kappa B pathways in larval hematopoiesis and drosomycin activation in Drosophila. *Developmental biology*. 288:60-72.

Cho, Y.S., L.M. Stevens, and D. Stein. 2010. Pipe-dependent ventral processing of Easter by Snake is the defining step in Drosophila embryo DV axis formation. *Current biology* : CB. 20:1133-1137.

Choe, K.M., H. Lee, and K.V. Anderson. 2005. Drosophila peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:1122-1126.

Choe, K.M., T. Werner, S. Stoven, D. Hultmark, and K.V. Anderson. 2002. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in Drosophila. *Science*. 296:359-362.

Clague, M.J., J.M. Coulson, and S. Urbe. 2012a. Cellular functions of the DUBs. *Journal of cell science*. 125:277-286.

Clague, M.J., H. Liu, and S. Urbe. 2012b. Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. *Developmental cell*. 23:457-467.

Clague, M.J., and S. Urbe. 2001. The interface of receptor trafficking and signalling. *Journal of cell science*. 114:3075-3081.

Clague, M.J., and S. Urbe. 2006. Endocytosis: the DUB version. *Trends in cell biology*. 16:551-559.

Cohn, M.A., Y. Kee, W. Haas, S.P. Gygi, and A.D. D'Andrea. 2009. UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. *The Journal of biological chemistry*. 284:5343-5351.

Cooney, R., J. Baker, O. Brain, B. Danis, T. Pichulik, P. Allan, D.J. Ferguson, B.J. Campbell, D. Jewell, and A. Simmons. 2010. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature medicine*. 16:90-97.

Coornaert, B., M. Baens, K. Heyninck, T. Bekaert, M. Haegman, J. Staal, L. Sun, Z.J. Chen, P. Marynen, and R. Beyaert. 2008. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. *Nature immunology*. 9:263-271.

Corbo, J.C., and M. Levine. 1996. Characterization of an immunodeficiency mutant in Drosophila. *Mechanisms of development*. 55:211-220.

d'Azzo, A., A. Bongiovanni, and T. Nastasi. 2005. E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic*. 6:429-441.

De Camilli, P., H. Chen, J. Hyman, E. Panepucci, A. Bateman, and A.T. Brunger. 2002. The ENTH domain. *FEBS letters*. 513:11-18.

De Gregorio, E., P.T. Spellman, G.M. Rubin, and B. Lemaitre. 2001. Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:12590-12595.

De Gregorio, E., P.T. Spellman, P. Tzou, G.M. Rubin, and B. Lemaitre. 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in Drosophila. *The EMBO journal*. 21:2568-2579.

## Références bibliographiques

---

de la Fuente, H., D. Cibrian, and F. Sanchez-Madrid. 2012. Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response. *FEBS letters*. 586:2897-2905.

DeLotto, Y., and R. DeLotto. 1998. Proteolytic processing of the Drosophila Spatzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity. *Mechanisms of development*. 72:141-148.

Denef, N., D. Neubuser, L. Perez, and S.M. Cohen. 2000. Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell*. 102:521-531.

Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z.J. Chen. 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. 103:351-361.

Desterro, J.M., M.S. Rodriguez, and R.T. Hay. 1998. SUMO-1 modification of IkappaBalphA inhibits NF-kappaB activation. *Molecular cell*. 2:233-239.

Di Guglielmo, G.M., C. Le Roy, A.F. Goodfellow, and J.L. Wrana. 2003. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nature cell biology*. 5:410-421.

Diamond, G., N. Beckloff, A. Weinberg, and K.O. Kisich. 2009. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Current pharmaceutical design*. 15:2377-2392.

Doherty, T.A., S.D. Brydges, and H.M. Hoffman. 2011. Autoinflammation: translating mechanism to therapy. *Journal of leukocyte biology*. 90:37-47.

Drag, M., J. Mikolajczyk, M. Bekes, F.E. Reyes-Turcu, J.A. Ellman, K.D. Wilkinson, and G.S. Salvesen. 2008. Positional-scanning fluorogenic substrate libraries reveal unexpected specificity determinants of DUBs (deubiquitinating enzymes). *The Biochemical journal*. 415:367-375.

Dupre, S., and R. Haguener-Tsapis. 2001. Deubiquitination step in the endocytic pathway of yeast plasma membrane proteins: crucial role of Doa4p ubiquitin isopeptidase. *Molecular and cellular biology*. 21:4482-4494.

Dushay, M.S., B. Asling, and D. Hultmark. 1996. Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:10343-10347.

Dyne, J.N., T. Goncharov, E.C. Dueber, A.V. Fedorova, A. Izrael-Tomasevic, L. Phu, E. Helgason, W.J. Fairbrother, K. Deshayes, D.S. Kirkpatrick, and D. Vucic. 2010. c-IAP1 and UbcH5 promote K11-linked polyubiquitination of RIP1 in TNF signalling. *The EMBO journal*. 29:4198-4209.

Dziarski, R., and D. Gupta. 2006. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome biology*. 7:232.

Edelmann, B., U. Bertsch, V. Tchikov, S. Winoto-Morbach, C. Perrotta, M. Jakob, S. Adam-Klages, D. Kabelitz, and S. Schutze. 2011. Caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *The EMBO journal*. 30:379-394.

Edelmann, M.J., A. Iphofer, M. Akutsu, M. Altun, K. di Gleria, H.B. Kramer, E. Fiebiger, S. Dhe-Paganon, and B.M. Kessler. 2009. Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination. *The Biochemical journal*. 418:379-390.

## Références bibliographiques

---

Edwards, D.N., P. Towb, and S.A. Wasserman. 1997. An activity-dependent network of interactions links the Rel protein Dorsal with its cytoplasmic regulators. *Development*. 124:3855-3864.

El Chamy, L., V. Leclerc, I. Caldelari, and J.M. Reichhart. 2008. Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll. *Nature immunology*. 9:1165-1170.

Emmerich, C.H., A.C. Schmukle, and H. Walczak. 2011. The emerging role of linear ubiquitination in cell signaling. *Science signaling*. 4:re5.

Endo, A., M. Matsumoto, T. Inada, A. Yamamoto, K.I. Nakayama, N. Kitamura, and M. Komada. 2009. Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. *Journal of cell science*. 122:678-686.

Enesa, K., K. Ito, A. Luong le, I. Thorbjornsen, C. Phua, Y. To, J. Dean, D.O. Haskard, J. Boyle, I. Adcock, and P.C. Evans. 2008a. Hydrogen peroxide prolongs nuclear localization of NF-kappaB in activated cells by suppressing negative regulatory mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 283:18582-18590.

Filipe, S.R., A. Tomasz, and P. Ligoxygakis. 2005. Requirements of peptidoglycan structure that allow detection by the Drosophila Toll pathway. *EMBO reports*. 6:327-333.

Fischer-Vize, J.A., G.M. Rubin, and R. Lehmann. 1992. The fat facets gene is required for Drosophila eye and embryo development. *Development*. 116:985-1000.

Fischer, J.A. 2003. Deubiquitinating enzymes: their roles in development, differentiation, and disease. *International review of cytology*. 229:43-72.

Fischer, R., O. Maier, M. Naumer, A. Krippner-Heidenreich, P. Scheurich, and K. Pfizenmaier. 2011. Ligand-induced internalization of TNF receptor 2 mediated by a di-leucin motif is dispensable for activation of the NFkappaB pathway. *Cellular signalling*. 23:161-170.

Fisher, R.D., B. Wang, S.L. Alam, D.S. Higginson, H. Robinson, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2003. Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *The Journal of biological chemistry*. 278:28976-28984.

Flajnik, M.F., and M. Kasahara. 2010. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nature reviews. Genetics*. 11:47-59.

Frias-Staheli, N., N.V. Giannakopoulos, M. Kikkert, S.L. Taylor, A. Bridgen, J. Paragas, J.A. Richt, R.R. Rowland, C.S. Schmaljohn, D.J. Lenschow, E.J. Snijder, A. Garcia-Sastre, and H.W.t. Virgin. 2007. Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. *Cell host & microbe*. 2:404-416.

Froquet, R., M. le Coadic, J. Perrin, N. Cherix, S. Cornillon, and P. Cosson. 2012. TM9/Phg1 and SadA proteins control surface expression and stability of SibA adhesion molecules in Dictyostelium. *Molecular biology of the cell*. 23:679-686.

Fukuyama, H., Y. Verdier, Y. Guan, C. Makino-Okamura, V. Shilova, X. Liu, E. Maksoud, J. Matsubayashi, I. Haddad, K. Spirohn, K. Ono, C. Hetru, J. Rossier, T. Ideker, M. Boutros, J. Vinh, and J.A. Hoffmann. 2013. Landscape of protein-protein interactions in Drosophila immune deficiency signaling during bacterial challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:10717-10722.

Galko, M.J., and M.A. Krasnow. 2004. Cellular and genetic analysis of wound healing in Drosophila larvae. *PLoS biology*. 2:E239.

## Références bibliographiques

---

Georgel, P., S. Naitza, C. Kappler, D. Ferrandon, D. Zachary, C. Swimmer, C. Kopczynski, G. Duyk, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 2001. Drosophila immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Developmental cell*. 1:503-514.

Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*. 16:225-260.

Gingras, M.C., Y.L. Zhang, D. Kharitidi, A.J. Barr, S. Knapp, M.L. Tremblay, and A. Pause. 2009. HD-PTP is a catalytically inactive tyrosine phosphatase due to a conserved divergence in its phosphatase domain. *PloS one*. 4:e5105.

Girardin, S.E., and D.J. Philpott. 2004. Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity. *European journal of immunology*. 34:1777-1782.

Gobert, V., M. Gottar, A.A. Matskevich, S. Rutschmann, J. Royet, M. Belvin, J.A. Hoffmann, and D. Ferrandon. 2003. Dual activation of the Drosophila toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science*. 302:2126-2130.

Goldszmid, R.S., and G. Trinchieri. 2012. The price of immunity. *Nature immunology*. 13:932-938.

Goodrich, J.S., K.N. Clouse, and T. Schupbach. 2004. Hrb27C, Sqd and Otu cooperatively regulate gurken RNA localization and mediate nurse cell chromosome dispersion in Drosophila oogenesis. *Development*. 131:1949-1958.

Gottar, M., V. Gobert, A.A. Matskevich, J.M. Reichhart, C. Wang, T.M. Butt, M. Belvin, J.A. Hoffmann, and D. Ferrandon. 2006. Dual detection of fungal infections in Drosophila via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell*. 127:1425-1437.

Gottar, M., V. Gobert, T. Michel, M. Belvin, G. Duyk, J.A. Hoffmann, D. Ferrandon, and J. Royet. 2002. The Drosophila immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*. 416:640-644.

Graner, E., D. Tang, S. Rossi, A. Baron, T. Migita, L.J. Weinstein, M. Lechpammer, D. Huesken, J. Zimmermann, S. Signoretti, and M. Loda. 2004. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer cell*. 5:253-261.

Greenwald, I., and R. Kovall. 2013. Notch signaling: genetics and structure. *WormBook : the online review of C. elegans biology*:1-28.

Gross, I., P. Georgel, C. Kappler, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1996. Drosophila immunity: a comparative analysis of the Rel proteins dorsal and Dif in the induction of the genes encoding diptericin and cecropin. *Nucleic acids research*. 24:1238-1245.

Grosshans, J., F. Schnorrer, and C. Nusslein-Volhard. 1999. Oligomerisation of Tube and Pelle leads to nuclear localisation of dorsal. *Mechanisms of development*. 81:127-138.

Gruenberg, J., and H. Stenmark. 2004. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5:317-323.

Haas, A.L., and P.M. Bright. 1987. The dynamics of ubiquitin pools within cultured human lung fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 262:345-351.

Hadari, T., J.V. Warms, I.A. Rose, and A. Hershko. 1992. A ubiquitin C-terminal isopeptidase that acts on polyubiquitin chains. Role in protein degradation. *The Journal of biological chemistry*. 267:719-727.

Haghayeghi, A., A. Sarac, S. Czerniecki, J. Grosshans, and F. Schock. 2010. Pellino enhances innate immunity in Drosophila. *Mechanisms of development*. 127:301-307.

Haglund, K., and I. Dikic. 2005. Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO journal*. 24:3353-3359.

## Références bibliographiques

---

Haglund, K., S. Sigismund, S. Polo, I. Szymkiewicz, P.P. Di Fiore, and I. Dikic. 2003. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nature cell biology*. 5:461-466.

Hanafy, K.A., and J.A. Sloane. 2011. Regulation of remyelination in multiple sclerosis. *FEBS letters*. 585:3821-3828.

Hay, R.T., L. Vuillard, J.M. Desterro, and M.S. Rodriguez. 1999. Control of NF-kappa B transcriptional activation by signal induced proteolysis of I kappa B alpha. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 354:1601-1609.

Hegde, A.N., K. Inokuchi, W. Pei, A. Casadio, M. Ghirardi, D.G. Chain, K.C. Martin, E.R. Kandel, and J.H. Schwartz. 1997. Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell*. 89:115-126.

Herrmann, J., L.O. Lerman, and A. Lerman. 2007. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circulation research*. 100:1276-1291.

Hershko, A., A. Ciechanover, and A. Varshavsky. 2000. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nature medicine*. 6:1073-1081.

Hetru, C., and J.A. Hoffmann. 2009. NF-kappaB in the immune response of Drosophila. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 1:a000232.

Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:195-201.

Hicke, L., and H. Riezman. 1996. Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*. 84:277-287.

Hicke, L., H.L. Schubert, and C.P. Hill. 2005. Ubiquitin-binding domains. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6:610-621.

Hirano, S., M. Kawasaki, H. Ura, R. Kato, C. Raiborg, H. Stenmark, and S. Wakatsuki. 2006. Double-sided ubiquitin binding of Hrs-UIM in endosomal protein sorting. *Nature structural & molecular biology*. 13:272-277.

Hisamatsu, T., H. Ogata, and T. Hibi. 2008. Innate immunity in inflammatory bowel disease: state of the art. *Current opinion in gastroenterology*. 24:448-454.

Hoeller, D., N. Crosetto, B. Blagoev, C. Raiborg, R. Tikkanen, S. Wagner, K. Kowanetz, R. Breitling, M. Mann, H. Stenmark, and I. Dikic. 2006. Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nature cell biology*. 8:163-169.

Hoffmann, J.A., F.C. Kafatos, C.A. Janeway, and R.A. Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 284:1313-1318.

Hoffmann, J.A., and J.M. Reichhart. 2002. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature immunology*. 3:121-126.

Honda, K., H. Yanai, T. Mizutani, H. Negishi, N. Shimada, N. Suzuki, Y. Ohba, A. Takaoka, W.C. Yeh, and T. Taniguchi. 2004. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:15416-15421.

Hoppe, T. 2005. Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends in biochemical sciences*. 30:183-187.

Hsu, H., J. Huang, H.B. Shu, V. Baichwal, and D.V. Goeddel. 1996a. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*. 4:387-396.

## Références bibliographiques

---

Hsu, H., H.B. Shu, M.G. Pan, and D.V. Goeddel. 1996b. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*. 84:299-308.

Hu, M., P. Li, M. Li, W. Li, T. Yao, J.W. Wu, W. Gu, R.E. Cohen, and Y. Shi. 2002. Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell*. 111:1041-1054.

Hu, M., P. Li, L. Song, P.D. Jeffrey, T.A. Chenova, K.D. Wilkinson, R.E. Cohen, and Y. Shi. 2005. Structure and mechanisms of the proteasome-associated deubiquitinating enzyme USP14. *The EMBO journal*. 24:3747-3756.

Hu, S., and X. Yang. 2000. dFADD, a novel death domain-containing adapter protein for the Drosophila caspase DREDD. *The Journal of biological chemistry*. 275:30761-30764.

Huang, F., D. Kirkpatrick, X. Jiang, S. Gygi, and A. Sorkin. 2006. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Molecular cell*. 21:737-748.

Huang, H.R., Z.J. Chen, S. Kunes, G.D. Chang, and T. Maniatis. 2010. Endocytic pathway is required for Drosophila Toll innate immune signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:8322-8327.

Huang, Y., R.T. Baker, and J.A. Fischer-Vize. 1995. Control of cell fate by a deubiquitinating enzyme encoded by the fat facets gene. *Science*. 270:1828-1831.

Hultmark, D. 2003. Drosophila immunity: paths and patterns. *Current opinion in immunology*. 15:12-19.

Husebye, H., O. Halaas, H. Stenmark, G. Tunheim, O. Sandanger, B. Bogen, A. Brech, E. Latz, and T. Espevik. 2006. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO journal*. 25:683-692.

Hyttinen, J.M., M. Niittykoski, A. Salminen, and K. Kaarniranta. 2013. Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochimica et biophysica acta*. 1833:503-510.

Imler, J.L., and J.A. Hoffmann. 2001. Toll receptors in innate immunity. *Trends in cell biology*. 11:304-311.

Irving, P., L. Troxler, T.S. Heuer, M. Belvin, C. Kopczynski, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann, and C. Hetru. 2001. A genome-wide analysis of immune responses in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:15119-15124.

Itoh, T., and T. Takenawa. 2009. Mechanisms of membrane deformation by lipid-binding domains. *Progress in lipid research*. 48:298-305.

Izore, T., V. Job, and A. Dessen. 2011. Biogenesis, regulation, and targeting of the type III secretion system. *Structure*. 19:603-612.

Janeway, C.A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 20:197-216.

Jia, T., Y. Pan, J. Li, and L. Wang. 2013. Strategies for active TNF-alpha vaccination in rheumatoid arthritis treatment. *Vaccine*.

Jin, L., A. Williamson, S. Banerjee, I. Philipp, and M. Rape. 2008. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell*. 133:653-665.

Jones, M.C., P.T. Caswell, and J.C. Norman. 2006. Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. *Current opinion in cell biology*. 18:549-557.

## Références bibliographiques

---

Kagan, J.C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nature immunology*. 9:361-368.

Kanayama, A., R.B. Seth, L. Sun, C.K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y.H. Chiu, L. Deng, and Z.J. Chen. 2004. TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Molecular cell*. 15:535-548.

Kanazawa, C., E. Morita, M. Yamada, N. Ishii, S. Miura, H. Asao, T. Yoshimori, and K. Sugamura. 2003. Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation. *Biochemical and biophysical research communications*. 309:848-856.

Kaneko, T., W.E. Goldman, P. Mellroth, H. Steiner, K. Fukase, S. Kusumoto, W. Harley, A. Fox, D. Golenbock, and N. Silverman. 2004. Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the Drosophila IMD pathway. *Immunity*. 20:637-649.

Kaneko, T., and N. Silverman. 2005. Bacterial recognition and signalling by the Drosophila IMD pathway. *Cellular microbiology*. 7:461-469.

Kaneko, T., T. Yano, K. Aggarwal, J.H. Lim, K. Ueda, Y. Oshima, C. Peach, D. Erturk-Hasdemir, W.E. Goldman, B.H. Oh, S. Kurata, and N. Silverman. 2006. PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nature immunology*. 7:715-723.

Kang, D., G. Liu, A. Lundstrom, E. Gelius, and H. Steiner. 1998. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:10078-10082.

Kato, M., K. Miyazawa, and N. Kitamura. 2000. A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *The Journal of biological chemistry*. 275:37481-37487.

Katz, M., K. Shtiegman, P. Tal-Or, L. Yakir, Y. Mosesson, D. Harari, Y. Machluf, H. Asao, T. Jovin, K. Sugamura, and Y. Yarden. 2002. Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic*. 3:740-751.

Katzmann, D.J., G. Odorizzi, and S.D. Emr. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 3:893-905.

Kawaguchi, Y., T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, I. Akiguchi, and et al. 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature genetics*. 8:221-228.

Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 11:373-384.

Kee, Y., N. Lyon, and J.M. Huibregtse. 2005. The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *The EMBO journal*. 24:2414-2424.

Khush, R.S., W.D. Cornwell, J.N. Uram, and B. Lemaitre. 2002. A ubiquitin-proteasome pathway represses the Drosophila immune deficiency signaling cascade. *Current biology : CB*. 12:1728-1737.

Kim, M.S., M. Byun, and B.H. Oh. 2003. Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from Drosophila melanogaster. *Nature immunology*. 4:787-793.

## Références bibliographiques

---

Kim, W., E.J. Bennett, E.L. Huttlin, A. Guo, J. Li, A. Possemato, M.E. Sowa, R. Rad, J. Rush, M.J. Comb, J.W. Harper, and S.P. Gygi. 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular cell*. 44:325-340.

Kimbrell, D.A., and B. Beutler. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nature reviews. Genetics*. 2:256-267.

Kleino, A., H. Myllymaki, J. Kallio, L.M. Vanha-aho, K. Oksanen, J. Ulvila, D. Hultmark, S. Valanne, and M. Ramet. 2008. Pirk is a negative regulator of the Drosophila Imd pathway. *J Immunol*. 180:5413-5422.

Kleino, A., S. Valanne, J. Ulvila, J. Kallio, H. Myllymaki, H. Enwald, S. Stoven, M. Poidevin, R. Ueda, D. Hultmark, B. Lemaitre, and M. Ramet. 2005. Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the Drosophila Imd pathway. *The EMBO journal*. 24:3423-3434.

Knox, P.G., C.C. Davies, M. Ioannou, and A.G. Eliopoulos. 2011. The death domain kinase RIP1 links the immunoregulatory CD40 receptor to apoptotic signaling in carcinomas. *The Journal of cell biology*. 192:391-399.

Komada, M. 2008. Controlling receptor downregulation by ubiquitination and deubiquitination. *Current drug discovery technologies*. 5:78-84.

Komander, D., M.J. Clague, and S. Urbe. 2009a. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:550-563.

Komander, D., C.J. Lord, H. Scheel, S. Swift, K. Hofmann, A. Ashworth, and D. Barford. 2008. The structure of the CYLD USP domain explains its specificity for Lys63-linked polyubiquitin and reveals a B box module. *Molecular cell*. 29:451-464.

Komander, D., F. Reyes-Turcu, J.D. Licchesi, P. Odenwaelder, K.D. Wilkinson, and D. Barford. 2009b. Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains. *EMBO reports*. 10:466-473.

Kopan, R., and M.X. Ilagan. 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*. 137:216-233.

Kornberg, T.B., and M.A. Krasnow. 2000. The Drosophila genome sequence: implications for biology and medicine. *Science*. 287:2218-2220.

Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2009. Pathogen recognition in the innate immune response. *The Biochemical journal*. 420:1-16.

Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 30:16-34.

Kumar, K.G., H. Barriere, C.J. Carbone, J. Liu, G. Swaminathan, P. Xu, Y. Li, D.P. Baker, J. Peng, G.L. Lukacs, and S.Y. Fuchs. 2007. Site-specific ubiquitination exposes a linear motif to promote interferon-alpha receptor endocytosis. *The Journal of cell biology*. 179:935-950.

Kurata, S. 2004. Recognition of infectious non-self and activation of immune responses by peptidoglycan recognition protein (PGRP)-family members in Drosophila. *Developmental and comparative immunology*. 28:89-95.

Kurata, S. 2010. Extracellular and intracellular pathogen recognition by Drosophila PGRP-LE and PGRP-LC. *International immunology*. 22:143-148.

Kurata, S., S. Ariki, and S. Kawabata. 2006. Recognition of pathogens and activation of immune responses in Drosophila and horseshoe crab innate immunity. *Immunobiology*. 211:237-249.

Kurtz, J. 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends in immunology*. 26:186-192.

## Références bibliographiques

---

Lange, A., C. Castaneda, D. Hoeller, J.M. Lancelin, D. Fushman, and O. Walker. 2012. Evidence for Cooperative and Domain-specific Binding of the Signal Transducing Adaptor Molecule 2 (STAM2) to Lys63-linked Diubiquitin. *The Journal of biological chemistry*. 287:18687-18699.

Larsen, C.N., B.A. Krantz, and K.D. Wilkinson. 1998. Substrate specificity of deubiquitinating enzymes: ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochemistry*. 37:3358-3368.

Lata, S., G. Schoehn, J. Solomons, R. Pires, H.G. Gottlinger, and W. Weissenhorn. 2009. Structure and function of ESCRT-III. *Biochemical Society transactions*. 37:156-160.

Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K.A. Fitzgerald, B.G. Monks, E.A. Kurt-Jones, D.T. Golenbock, and T. Espevik. 2002. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 277:47834-47843.

Laurie, S.A., and G.D. Goss. 2013. Role of epidermal growth factor receptor inhibitors in epidermal growth factor receptor wild-type non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 31:1061-1069.

Lauwers, E., C. Jacob, and B. Andre. 2009. K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *The Journal of cell biology*. 185:493-502.

Lemaitre, B., and J. Hoffmann. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology*. 25:697-743.

Lemaitre, B., E. Kromer-Metzger, L. Michaut, E. Nicolas, M. Meister, P. Georgel, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1995. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:9465-9469.

Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86:973-983.

Lemaitre, B., J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:14614-14619.

Leone, P., V. Bischoff, C. Kellenberger, C. Hetru, J. Royet, and A. Roussel. 2008. Crystal structure of *Drosophila* PGRP-SD suggests binding to DAP-type but not lysine-type peptidoglycan. *Molecular immunology*. 45:2521-2530.

Leroy, E., R. Boyer, G. Auburger, B. Leube, G. Ulm, E. Mezey, G. Harta, M.J. Brownstein, S. Jonnalagada, T. Chernova, A. Dehejia, C. Lavedan, T. Gasser, P.J. Steinbach, K.D. Wilkinson, and M.H. Polymeropoulos. 1998. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*. 395:451-452.

Leulier, F., C. Parquet, S. Pili-Floury, J.H. Ryu, M. Caroff, W.J. Lee, D. Mengin-Lecreulx, and B. Lemaitre. 2003. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature immunology*. 4:478-484.

Leung, K.F., J.B. Dacks, and M.C. Field. 2008. Evolution of the multivesicular body ESCRT machinery; retention across the eukaryotic lineage. *Traffic*. 9:1698-1716.

## Références bibliographiques

---

Levkowitz, G., H. Waterman, S.A. Ettenberg, M. Katz, A.Y. Tsygankov, I. Alroy, S. Lavi, K. Iwai, Y. Reiss, A. Ciechanover, S. Lipkowitz, and Y. Yarden. 1999. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Molecular cell*. 4:1029-1040.

Lhocine, N., P.S. Ribeiro, N. Buchon, A. Wepf, R. Wilson, T. Tenev, B. Lemaitre, M. Gstaiger, P. Meier, and F. Leulier. 2008. PIMS modulates immune tolerance by negatively regulating Drosophila innate immune signaling. *Cell host & microbe*. 4:147-158.

Li, S., Y. Chen, Q. Shi, T. Yue, B. Wang, and J. Jiang. 2012. Hedgehog-regulated ubiquitination controls smoothed trafficking and cell surface expression in Drosophila. *PLoS biology*. 10:e1001239.

Li, S., A. Strelow, E.J. Fontana, and H. Wesche. 2002. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:5567-5572.

Lim, J.H., M.S. Kim, H.E. Kim, T. Yano, Y. Oshima, K. Aggarwal, W.E. Goldman, N. Silverman, S. Kurata, and B.H. Oh. 2006. Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. *The Journal of biological chemistry*. 281:8286-8295.

Lin, H., L. Yin, J. Reid, K.D. Wilkinson, and S.S. Wing. 2001. Divergent N-terminal sequences of a deubiquitinating enzyme modulate substrate specificity. *The Journal of biological chemistry*. 276:20357-20363.

Litman, G.W., J.P. Rast, and S.D. Fugmann. 2010. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*. 10:543-553.

Liu, C., Z. Xu, D. Gupta, and R. Dziarski. 2001. Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *The Journal of biological chemistry*. 276:34686-34694.

Liu, Y., L. Fallon, H.A. Lashuel, Z. Liu, and P.T. Lansbury, Jr. 2002. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*. 111:209-218.

Liu, Z., S.M. Zanata, J. Kim, M.A. Peterson, D. Di Vizio, L.R. Chiriac, S. Pyne, M. Agostini, M.R. Freeman, and M. Loda. 2012. The ubiquitin-specific protease USP2a prevents endocytosis-mediated EGFR degradation. *Oncogene*.

Lloyd, T.E., R. Atkinson, M.N. Wu, Y. Zhou, G. Pennetta, and H.J. Bellen. 2002. Hrs regulates endosome membrane invagination and tyrosine kinase receptor signaling in Drosophila. *Cell*. 108:261-269.

Lo, D., W. Tynan, J. Dickerson, J. Mendy, H.W. Chang, M. Scharf, D. Byrne, D. Brayden, L. Higgins, C. Evans, and D.J. O'Mahony. 2003. Peptidoglycan recognition protein expression in mouse Peyer's Patch follicle associated epithelium suggests functional specialization. *Cellular immunology*. 224:8-16.

Loeb, K.R., and A.L. Haas. 1994. Conjugates of ubiquitin cross-reactive protein distribute in a cytoskeletal pattern. *Molecular and cellular biology*. 14:8408-8419.

Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42:145-151.

Lund, V.K., Y. DeLotto, and R. DeLotto. 2010. Endocytosis is required for Toll signaling and shaping of the Dorsal/NF-kappaB morphogen gradient during Drosophila embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:18028-18033.

## Références bibliographiques

---

Ma, Y.M., E. Boucrot, J. Villen, B. Affar el, S.P. Gygi, H.G. Gottlinger, and T. Kirchhausen. 2007. Targeting of AMSH to endosomes is required for epidermal growth factor receptor degradation. *The Journal of biological chemistry*. 282:9805-9812.

Mahul-Mellier, A.L., F. Strappazzon, A. Petiot, C. Chatellard-Causse, S. Torch, B. Blot, K. Freeman, L. Kuhn, J. Garin, J.M. Verna, S. Fraboulet, and R. Sadoul. 2008. Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death. *The Journal of biological chemistry*. 283:34954-34965.

Maillet, F., V. Bischoff, C. Vignal, J. Hoffmann, and J. Royet. 2008. The Drosophila peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation. *Cell host & microbe*. 3:293-303.

Makarova, K.S., L. Aravind, and E.V. Koonin. 2000. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and Chlamydia pneumoniae. *Trends in biochemical sciences*. 25:50-52.

Malakhov, M.P., O.A. Malakhova, K.I. Kim, K.J. Ritchie, and D.E. Zhang. 2002. UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *The Journal of biological chemistry*. 277:9976-9981.

Manfruelli, P., J.M. Reichhart, R. Steward, J.A. Hoffmann, and B. Lemaitre. 1999. A mosaic analysis in Drosophila fat body cells of the control of antimicrobial peptide genes by the Rel proteins Dorsal and DIF. *The EMBO journal*. 18:3380-3391.

Mao, Y., F. Senic-Matuglia, P.P. Di Fiore, S. Polo, M.E. Hodsdon, and P. De Camilli. 2005. Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:12700-12705.

Markiewski, M.M., B. Nilsson, K.N. Ekdahl, T.E. Mollnes, and J.D. Lambris. 2007. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends in immunology*. 28:184-192.

Marmor, M.D., and Y. Yarden. 2004. Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene*. 23:2057-2070.

Masuda, H., D. Zhang, C. Bartholomeusz, H. Doihara, G.N. Hortobagyi, and N.T. Ueno. 2012. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 136:331-345.

Maupin-Furlow, J.A. 2013. Ubiquitin-like proteins and their roles in archaea. *Trends in microbiology*. 21:31-38.

Mayers, J.R., I. Fyfe, A.L. Schuh, E.R. Chapman, J.M. Edwardson, and A. Audhya. 2011. ESCRT-0 assembles as a heterotetrameric complex on membranes and binds multiple ubiquitinylated cargoes simultaneously. *The Journal of biological chemistry*. 286:9636-9645.

Mayo, L., F.J. Quintana, and H.L. Weiner. 2012. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunological reviews*. 248:170-187.

McCullough, J., M.J. Clague, and S. Urbe. 2004. AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *The Journal of cell biology*. 166:487-492.

McCullough, J., P.E. Row, O. Lorenzo, M. Doherty, R. Beynon, M.J. Clague, and S. Urbe. 2006. Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Current biology : CB*. 16:160-165.

McGettrick, A.F., and L.A. O'Neill. 2010. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Current opinion in immunology*. 22:20-27.

## Références bibliographiques

---

McMahon, H.T., and J.L. Gallop. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. 438:590-596.

Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 449:819-826.

Medzhitov, R., and C.A. Janeway, Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 296:298-300.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388:394-397.

Mellroth, P., J. Karlsson, J. Hakansson, N. Schultz, W.E. Goldman, and H. Steiner. 2005. Ligand-induced dimerization of *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:6455-6460.

Mellroth, P., and H. Steiner. 2006. PGRP-SB1: an N-acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochemical and biophysical research communications*. 350:994-999.

Micheau, O., and J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 114:181-190.

Michel, T., J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann, and J. Royet. 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*. 414:756-759.

Miura, G.I., J.Y. Roignant, M. Wassef, and J.E. Treisman. 2008. Myopic acts in the endocytic pathway to enhance signaling by the *Drosophila* EGF receptor. *Development*. 135:1913-1922.

Mizuno, E., T. Iura, A. Mukai, T. Yoshimori, N. Kitamura, and M. Komada. 2005. Regulation of epidermal growth factor receptor down-regulation by UBPY-mediated deubiquitination at endosomes. *Molecular biology of the cell*. 16:5163-5174.

Mizuno, E., K. Kobayashi, A. Yamamoto, N. Kitamura, and M. Komada. 2006. A deubiquitinating enzyme UBPY regulates the level of protein ubiquitination on endosomes. *Traffic*. 7:1017-1031.

Mogensen, T.H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*. 22:240-273, Table of Contents.

Moncrieffe, M.C., J.G. Grossmann, and N.J. Gay. 2008. Assembly of oligomeric death domain complexes during Toll receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 283:33447-33454.

Moretti, J., P. Chastagner, C.C. Liang, M.A. Cohn, A. Israel, and C. Brou. 2012. The ubiquitin-specific protease 12 (USP12) is a negative regulator of notch signaling acting on notch receptor trafficking toward degradation. *The Journal of biological chemistry*. 287:29429-29441.

Mosesson, Y., K. Shtiegman, M. Katz, Y. Zwang, G. Vereb, J. Szollosi, and Y. Yarden. 2003. Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. *The Journal of biological chemistry*. 278:21323-21326.

Moynagh, P.N. 2009. The Pellino family: IRAK E3 ligases with emerging roles in innate immune signalling. *Trends in immunology*. 30:33-42.

Nakamura, M., N. Tanaka, N. Kitamura, and M. Komada. 2006. Clathrin anchors deubiquitinating enzymes, AMSH and AMSH-like protein, on early endosomes. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 11:593-606.

## Références bibliographiques

---

Nanao, M.H., S.O. Tcherniuk, J. Chroboczek, O. Dideberg, A. Dessen, and M.Y. Balakirev. 2004. Crystal structure of human otubain 2. *EMBO reports*. 5:783-788.

Neumeyer, J., C. Hallas, O. Merkel, S. Winoto-Morbach, M. Jakob, L. Thon, D. Adam, W. Schneider-Brachert, and S. Schutze. 2006. TNF-receptor I defective in internalization allows for cell death through activation of neutral sphingomyelinase. *Experimental cell research*. 312:2142-2153.

Newton, K., M.L. Matsumoto, I.E. Wertz, D.S. Kirkpatrick, J.R. Lill, J. Tan, D. Dugger, N. Gordon, S.S. Sidhu, F.A. Fellouse, L. Komuves, D.M. French, R.E. Ferrando, C. Lam, D. Compaan, C. Yu, I. Bosanac, S.G. Hymowitz, R.F. Kelley, and V.M. Dixit. 2008. Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell*. 134:668-678.

Niendorf, S., A. Oksche, A. Kissner, J. Lohler, M. Prinz, H. Schorle, S. Feller, M. Lewitzky, I. Horak, and K.P. Knobeloch. 2007. Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Molecular and cellular biology*. 27:5029-5039.

Nijman, S.M., M.P. Luna-Vargas, A. Velds, T.R. Brummelkamp, A.M. Dirac, T.K. Sixma, and R. Bernards. 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*. 123:773-786.

Nikko, E., and B. Andre. 2007. Evidence for a direct role of the Doa4 deubiquitinating enzyme in protein sorting into the MVB pathway. *Traffic*. 8:566-581.

Nusslein-Volhard, C., and E. Wieschaus. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 287:795-801.

Nye, J.S., and R. Kopan. 1995. Developmental signaling. Vertebrate ligands for Notch. *Current biology : CB*. 5:966-969.

Oh, J.E., and H.K. Lee. 2013. Autophagy as an innate immune modulator. *Immune network*. 13:1-9.

Paddibhatla, I., M.J. Lee, M.E. Kalamarz, R. Ferrarese, and S. Govind. 2010. Role for sumoylation in systemic inflammation and immune homeostasis in *Drosophila* larvae. *PLoS pathogens*. 6:e1001234.

Palamidessi, A., E. Frittoli, M. Garre, M. Faretta, M. Mione, I. Testa, A. Diaspro, L. Lanzetti, G. Scita, and P.P. Di Fiore. 2008. Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*. 134:135-147.

Palsson-McDermott, E.M., S.L. Doyle, A.F. McGettrick, M. Hardy, H. Husebye, K. Banahan, M. Gong, D. Golenbock, T. Espevik, and L.A. O'Neill. 2009. TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway. *Nature immunology*. 10:579-586.

Panier, S., and D. Durocher. 2009. Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks. *DNA repair*. 8:436-443.

Paquette, N., M. Broemer, K. Aggarwal, L. Chen, M. Husson, D. Erturk-Hasdemir, J.M. Reichhart, P. Meier, and N. Silverman. 2010. Caspase-mediated cleavage, IAP binding, and ubiquitination: linking three mechanisms crucial for *Drosophila* NF-kappaB signaling. *Molecular cell*. 37:172-182.

Park, J.M., H. Brady, M.G. Ruocco, H. Sun, D. Williams, S.J. Lee, T. Kato, Jr., N. Richards, K. Chan, F. Mercurio, M. Karin, and S.A. Wasserman. 2004. Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes & development*. 18:584-594.

## Références bibliographiques

---

Pasparakis, M. 2012. Role of NF-kappaB in epithelial biology. *Immunological reviews*. 246:346-358.

Persson, C., S. Oldenvi, and H. Steiner. 2007. Peptidoglycan recognition protein LF: a negative regulator of *Drosophila* immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*. 37:1309-1316.

Pham, L.N., M.S. Dionne, M. Shirasu-Hiza, and D.S. Schneider. 2007. A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS pathogens*. 3:e26.

Pichler, A., P. Knipscheer, E. Oberhofer, W.J. van Dijk, R. Korner, J.V. Olsen, S. Jentsch, F. Melchior, and T.K. Sixma. 2005. SUMO modification of the ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K. *Nature structural & molecular biology*. 12:264-269.

Pickart, C.M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry*. 70:503-533.

Pickart, C.M., and M.J. Eddins. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*. 1695:55-72.

Piper, R.C., and P.J. Lehner. 2011. Endosomal transport via ubiquitination. *Trends in cell biology*. 21:647-655.

Polo, S., S. Pece, and P.P. Di Fiore. 2004. Endocytosis and cancer. *Current opinion in cell biology*. 16:156-161.

Polo, S., S. Sigismund, M. Faretta, M. Guidi, M.R. Capua, G. Bossi, H. Chen, P. De Camilli, and P.P. Di Fiore. 2002. A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*. 416:451-455.

Priolo, C., D. Tang, M. Brahamandan, B. Benassi, E. Sicinska, S. Ogino, A. Farsetti, A. Porrello, S. Finn, J. Zimmermann, P. Febbo, and M. Loda. 2006. The isopeptidase USP2a protects human prostate cancer from apoptosis. *Cancer research*. 66:8625-8632.

Rahighi, S., and I. Dikic. 2012. Selectivity of the ubiquitin-binding modules. *FEBS letters*.

Raiborg, C., K.G. Bache, A. Mehlum, E. Stang, and H. Stenmark. 2001. Hrs recruits clathrin to early endosomes. *The EMBO journal*. 20:5008-5021.

Raiborg, C., and H. Stenmark. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. 458:445-452.

Ramet, M., P. Manfruelli, A. Pearson, B. Mathey-Prevot, and R.A. Ezekowitz. 2002. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature*. 416:644-648.

Randow, F., J.D. MacMicking, and L.C. James. 2013. Cellular self-defense: how cell-autonomous immunity protects against pathogens. *Science*. 340:701-706.

Rao, Y., C. Ruckert, W. Saenger, and V. Haucke. 2012. The early steps of endocytosis: from cargo selection to membrane deformation. *European journal of cell biology*. 91:226-233.

Reiley, W., M. Zhang, X. Wu, E. Granger, and S.C. Sun. 2005. Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by IkappaB kinase gamma-dependent phosphorylation. *Molecular and cellular biology*. 25:3886-3895.

Renatus, M., S.G. Parrado, A. D'Arcy, U. Eidhoff, B. Gerhartz, U. Hassiepen, B. Pierrat, R. Riedl, D. Vinzenz, S. Worpenberg, and M. Kroemer. 2006. Structural basis of ubiquitin recognition by the deubiquitinating protease USP2. *Structure*. 14:1293-1302.

Reyes-Turcu, F.E., and K.D. Wilkinson. 2009. Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes. *Chemical reviews*. 109:1495-1508.

## Références bibliographiques

---

Riess, O., U. Rub, A. Pastore, P. Bauer, and L. Schols. 2008. SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum*. 7:125-137.

Rosetto, M., Y. Engstrom, C.T. Baldari, J.L. Telford, and D. Hultmark. 1995. Signals from the IL-1 receptor homolog, Toll, can activate an immune response in a *Drosophila* hemocyte cell line. *Biochemical and biophysical research communications*. 209:111-116.

Row, P.E., H. Liu, S. Hayes, R. Welchman, P. Charalabous, K. Hofmann, M.J. Clague, C.M. Sanderson, and S. Urbe. 2007. The MIT domain of UBPY constitutes a CHMP binding and endosomal localization signal required for efficient epidermal growth factor receptor degradation. *The Journal of biological chemistry*. 282:30929-30937.

Row, P.E., I.A. Prior, J. McCullough, M.J. Clague, and S. Urbe. 2006. The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *The Journal of biological chemistry*. 281:12618-12624.

Rowe, D.C., A.F. McGettrick, E. Latz, B.G. Monks, N.J. Gay, M. Yamamoto, S. Akira, L.A. O'Neill, K.A. Fitzgerald, and D.T. Golenbock. 2006. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:6299-6304.

Roxrud, I., C. Raiborg, N.M. Pedersen, E. Stang, and H. Stenmark. 2008. An endosomally localized isoform of Eps15 interacts with Hrs to mediate degradation of epidermal growth factor receptor. *The Journal of cell biology*. 180:1205-1218.

Rutschmann, S., A.C. Jung, C. Hetru, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann, and D. Ferrandon. 2000. The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity*. 12:569-580.

Sadd, B.M., and P. Schmid-Hempel. 2006. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current biology : CB*. 16:1206-1210.

Sadowski, M., R. Suryadinata, A.R. Tan, S.N. Roesley, and B. Sarcevic. 2012. Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB life*. 64:136-142.

Saito, K., T. Kigawa, S. Koshiba, K. Sato, Y. Matsuo, A. Sakamoto, T. Takagi, M. Shirouzu, T. Yabuki, E. Nunokawa, E. Seki, T. Matsuda, M. Aoki, Y. Miyata, N. Hirakawa, M. Inoue, T. Terada, T. Nagase, R. Kikuno, M. Nakayama, O. Ohara, A. Tanaka, and S. Yokoyama. 2004. The CAP-Gly domain of CYLD associates with the proline-rich sequence in NEMO/IKKgamma. *Structure*. 12:1719-1728.

Sato, S., C. St-Pierre, P. Bhaumik, and J. Nieminen. 2009. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunological reviews*. 230:172-187.

Scheel, H., S. Tomiuk, and K. Hofmann. 2003. Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Human molecular genetics*. 12:2845-2852.

Schenten, D., and R. Medzhitov. 2011. The control of adaptive immune responses by the innate immune system. *Advances in immunology*. 109:87-124.

Schlenke, T.A., J. Morales, S. Govind, and A.G. Clark. 2007. Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *PLoS pathogens*. 3:1486-1501.

## Références bibliographiques

---

Schmidt, R.L., F.M. Rinaldo, S.E. Hesse, M. Hamada, Z. Ortiz, D.T. Beleford, A. Page-McCaw, J.L. Platt, and A.H. Tang. 2011. Cleavage of PGRP-LC receptor in the Drosophila IMD pathway in response to live bacterial infection in S2 cells. *Self/nonself*. 2:125-141.

Schmidt, R.L., T.R. Trejo, T.B. Plummer, J.L. Platt, and A.H. Tang. 2008. Infection-induced proteolysis of PGRP-LC controls the IMD activation and melanization cascades in Drosophila. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 22:918-929.

Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, O. Merkel, M. Jakob, C. Hallas, M.L. Kruse, P. Groitl, A. Lehn, E. Hildt, J. Held-Feindt, T. Dobner, D. Kabelitz, M. Kronke, and S. Schutze. 2006. Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. *The Journal of clinical investigation*. 116:2901-2913.

Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz, and S. Schutze. 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity*. 21:415-428.

Schneider, D.S., Y. Jin, D. Morisato, and K.V. Anderson. 1994. A processed form of the Spatzle protein defines dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo. *Development*. 120:1243-1250.

Semple, C.A. 2003. The comparative proteomics of ubiquitination in mouse. *Genome research*. 13:1389-1394.

Shields, S.B., A.J. Oestreich, S. Winstorfer, D. Nguyen, J.A. Payne, D.J. Katzmann, and R. Piper. 2009. ESCRT ubiquitin-binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting. *The Journal of cell biology*. 185:213-224.

Sierra, M.I., M.H. Wright, and P.D. Nash. 2010. AMSH interacts with ESCRT-0 to regulate the stability and trafficking of CXCR4. *The Journal of biological chemistry*. 285:13990-14004.

Silverman, N., and T. Maniatis. 2001. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes & development*. 15:2321-2342.

Silverman, N., R. Zhou, R.L. Erlich, M. Hunter, E. Bernstein, D. Schneider, and T. Maniatis. 2003. Immune activation of NF-kappaB and JNK requires Drosophila TAK1. *The Journal of biological chemistry*. 278:48928-48934.

Silverman, N., R. Zhou, S. Stoven, N. Pandey, D. Hultmark, and T. Maniatis. 2000. A Drosophila IkappaB kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes & development*. 14:2461-2471.

Soderhall, K., and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current opinion in immunology*. 10:23-28.

Sorkin, A. 2007. Ubiquitination without E3. *Molecular cell*. 26:771-773.

Sorrentino, R.P., J.P. Melk, and S. Govind. 2004. Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in Drosophila. *Genetics*. 166:1343-1356.

Sowa, M.E., E.J. Bennett, S.P. Gygi, and J.W. Harper. 2009. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*. 138:389-403.

Stein, M.P., J. Dong, and A. Wandinger-Ness. 2003. Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews*. 55:1421-1437.

## Références bibliographiques

---

Steiner, H. 2004. Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunological reviews*. 198:83-96.

Stenbak, C.R., J.H. Ryu, F. Leulier, S. Pili-Floury, C. Parquet, M. Herve, C. Chaput, I.G. Boneca, W.J. Lee, B. Lemaitre, and D. Mengin-Lecreux. 2004. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the *Drosophila* immune deficiency pathway. *J Immunol*. 173:7339-7348.

Stenmark, H., and V.M. Olkkonen. 2001. The Rab GTPase family. *Genome biology*. 2:REVIEWS3007.

Stevenson, L.F., A. Sparks, N. Allende-Vega, D.P. Xirodimas, D.P. Lane, and M.K. Saville. 2007. The deubiquitinating enzyme USP2a regulates the p53 pathway by targeting Mdm2. *The EMBO journal*. 26:976-986.

Stoven, S., I. Ando, L. Kadalayil, Y. Engstrom, and D. Hultmark. 2000. Activation of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish by rapid endoproteolytic cleavage. *EMBO reports*. 1:347-352.

Stoven, S., N. Silverman, A. Junell, M. Hedengren-Olcott, D. Erturk, Y. Engstrom, T. Maniatis, and D. Hultmark. 2003. Caspase-mediated processing of the *Drosophila* NF-kappaB factor Relish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:5991-5996.

Sun, H., B.N. Bristow, G. Qu, and S.A. Wasserman. 2002. A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:12871-12876.

Sun, S.C., and I. Faye. 1992. Cecropia immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor kappa B. *European journal of biochemistry / FEBS*. 204:885-892.

Swaminathan, S., A.Y. Amerik, and M. Hochstrasser. 1999. The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Molecular biology of the cell*. 10:2583-2594.

Takehana, A., T. Katsuyama, T. Yano, Y. Oshima, H. Takada, T. Aigaki, and S. Kurata. 2002. Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates *imd*/*relish*-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:13705-13710.

Takehana, A., T. Yano, S. Mita, A. Kotani, Y. Oshima, and S. Kurata. 2004. Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *The EMBO journal*. 23:4690-4700.

Tanaka, N., K. Kaneko, H. Asao, H. Kasai, Y. Endo, T. Fujita, T. Takeshita, and K. Sugamura. 1999. Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *The Journal of biological chemistry*. 274:19129-19135.

Tang, E.D., C.Y. Wang, Y. Xiong, and K.L. Guan. 2003. A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*. 278:37297-37305.

Tanimura, N., S. Saitoh, F. Matsumoto, S. Akashi-Takamura, and K. Miyake. 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 368:94-99.

## Références bibliographiques

---

Tashiro, K., M.P. Pando, Y. Kanegae, P.M. Wamsley, S. Inoue, and I.M. Verma. 1997. Direct involvement of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9/Hus5 in the degradation of IkappaBalph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:7862-7867.

Tatei, K., and M. Levine. 1995. Specificity of Rel-inhibitor interactions in Drosophila embryos. *Molecular and cellular biology*. 15:3627-3634.

Tauszig-Delamasure, S., H. Bilak, M. Capovilla, J.A. Hoffmann, and J.L. Imler. 2002. Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections. *Nature immunology*. 3:91-97.

Tauszig, S., E. Jouanguy, J.A. Hoffmann, and J.L. Imler. 2000. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:10520-10525.

Taya, S., T. Yamamoto, M. Kanai-Azuma, S.A. Wood, and K. Kaibuchi. 1999. The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes beta-catenin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 4:757-767.

Tchikov, V., U. Bertsch, J. Fritsch, B. Edelmann, and S. Schutze. 2011. Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. *European journal of cell biology*. 90:467-475.

Thevenon, D., E. Engel, A. Avet-Rochex, M. Gottar, E. Bergeret, H. Tricoire, C. Benaud, J. Baudier, E. Taillebourg, and M.O. Fauvarque. 2009. The Drosophila ubiquitin-specific protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signaling. *Cell host & microbe*. 6:309-320.

Thieblemont, N., and S.D. Wright. 1999. Transport of bacterial lipopolysaccharide to the golgi apparatus. *The Journal of experimental medicine*. 190:523-534.

Thrower, J.S., L. Hoffman, M. Rechsteiner, and C.M. Pickart. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal*. 19:94-102.

Ting, A.T., F.X. Pimentel-Muinos, and B. Seed. 1996. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *The EMBO journal*. 15:6189-6196.

Todi, S.V., B.J. Winborn, K.M. Scaglione, J.R. Blount, S.M. Travis, and H.L. Paulson. 2009. Ubiquitination directly enhances activity of the deubiquitinating enzyme ataxin-3. *The EMBO journal*. 28:372-382.

Tokunaga, F., and K. Iwai. 2012. Linear ubiquitination: a novel NF-kappaB regulatory mechanism for inflammatory and immune responses by the LUBAC ubiquitin ligase complex. *Endocrine journal*. 59:641-652.

Towb, P., A. Bergmann, and S.A. Wasserman. 2001. The protein kinase Pelle mediates feedback regulation in the Drosophila Toll signaling pathway. *Development*. 128:4729-4736.

Towb, P., H. Sun, and S.A. Wasserman. 2009. Tube Is an IRAK-4 homolog in a Toll pathway adapted for development and immunity. *Journal of innate immunity*. 1:309-321.

Traub, L.M. 2009. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:583-596.

Travassos, L.H., L.A. Carneiro, M. Ramjeet, S. Hussey, Y.G. Kim, J.G. Magalhaes, L. Yuan, F. Soares, E. Chea, L. Le Bourhis, I.G. Boneca, A. Allaoui, N.L. Jones, G. Nunez, S.E. Girardin, and D.J. Philpott. 2010. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature immunology*. 11:55-62.

## Références bibliographiques

---

Tsichritzis, T., P.C. Gaentzsch, S. Kosmidis, A.E. Brown, E.M. Skoulakis, P. Ligoxygakis, and G. Mosialos. 2007. A *Drosophila* ortholog of the human cylindromatosis tumor suppressor gene regulates triglyceride content and antibacterial defense. *Development*. 134:2605-2614.

Tsuda, M., C. Langmann, N. Harden, and T. Aigaki. 2005. The RING-finger scaffold protein Plenty of SH3s targets TAK1 to control immunity signalling in *Drosophila*. *EMBO reports*. 6:1082-1087.

Valanne, S., J.H. Wang, and M. Ramet. 2011. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *J Immunol*. 186:649-656.

van Delft, S., R. Govers, G.J. Strous, A.J. Verkleij, and P.M. van Bergen en Henegouwen. 1997. Epidermal growth factor induces ubiquitination of Eps15. *The Journal of biological chemistry*. 272:14013-14016.

van der Veen, A.G., and H.L. Ploegh. 2012. Ubiquitin-like proteins. *Annual review of biochemistry*. 81:323-357.

VanDemark, A.P., R.M. Hofmann, C. Tsui, C.M. Pickart, and C. Wolberger. 2001. Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell*. 105:711-720.

Varadan, R., M. Assfalg, A. Haririnia, S. Raasi, C. Pickart, and D. Fushman. 2004. Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *The Journal of biological chemistry*. 279:7055-7063.

Varfolomeev, E., J.W. Blankenship, S.M. Wayson, A.V. Fedorova, N. Kayagaki, P. Garg, K. Zobel, J.N. Dynek, L.O. Elliott, H.J. Wallweber, J.A. Flygare, W.J. Fairbrother, K. Deshayes, V.M. Dixit, and D. Vucic. 2007. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell*. 131:669-681.

Vidal, S., R.S. Khush, F. Leulier, P. Tzou, M. Nakamura, and B. Lemaitre. 2001. Mutations in the *Drosophila* dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kappaB-dependent innate immune responses. *Genes & development*. 15:1900-1912.

Vierstra, R.D. 2012. The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant physiology*. 160:2-14.

Wang, C., L. Deng, M. Hong, G.R. Akkaraju, J. Inoue, and Z.J. Chen. 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 412:346-351.

Wang, L., R.J. Gilbert, M.L. Atilano, S.R. Filipe, N.J. Gay, and P. Ligoxygakis. 2008. Peptidoglycan recognition protein-SD provides versatility of receptor formation in *Drosophila* immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:11881-11886.

Wasserman, S.A. 1993. A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like proteins dorsal and NF-kappa B. *Molecular biology of the cell*. 4:767-771.

Weber, A.N., M.C. Moncrieffe, M. Gangloff, J.L. Imler, and N.J. Gay. 2005. Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the *Drosophila* toll pathway. *The Journal of biological chemistry*. 280:22793-22799.

Weber, A.N., S. Tauszig-Delamasure, J.A. Hoffmann, E. Lelievre, H. Gascan, K.P. Ray, M.A. Morse, J.L. Imler, and N.J. Gay. 2003. Binding of the *Drosophila* cytokine Spatzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature immunology*. 4:794-800.

Weiner, H.L. 2008. A shift from adaptive to innate immunity: a potential mechanism of disease progression in multiple sclerosis. *Journal of neurology*. 255 Suppl 1:3-11.

## Références bibliographiques

---

Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:169-178.

Werner, T., K. Borge-Renberg, P. Mellroth, H. Steiner, and D. Hultmark. 2003. Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *The Journal of biological chemistry*. 278:26319-26322.

Werner, T., G. Liu, D. Kang, S. Ekengren, H. Steiner, and D. Hultmark. 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:13772-13777.

Wertz, I.E., K.M. O'Rourke, H. Zhou, M. Eby, L. Aravind, S. Seshagiri, P. Wu, C. Wiesmann, R. Baker, D.L. Boone, A. Ma, E.V. Koonin, and V.M. Dixit. 2004. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF- $\kappa$ B signalling. *Nature*. 430:694-699.

Wiegmann, K., R. Schwandner, O. Krut, W.C. Yeh, T.W. Mak, and M. Kronke. 1999. Requirement of FADD for tumor necrosis factor-induced activation of acid sphingomyelinase. *The Journal of biological chemistry*. 274:5267-5270.

Woelk, T., B. Oldrini, E. Maspero, S. Confalonieri, E. Cavallaro, P.P. Di Fiore, and S. Polo. 2006. Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination. *Nature cell biology*. 8:1246-1254.

Wolf, D.A., and M.D. Petroski. 2009. Rfu1: stimulus for the ubiquitin economy. *Cell*. 137:397-398.

Wolf, D.A., C. Zhou, and S. Wee. 2003. The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nature cell biology*. 5:1029-1033.

Wong, S.W., M.J. Kwon, A.M. Choi, H.P. Kim, K. Nakahira, and D.H. Hwang. 2009. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 284:27384-27392.

Wu, L.P., and K.V. Anderson. 1998. Regulated nuclear import of Rel proteins in the *Drosophila* immune response. *Nature*. 392:93-97.

Wu, L.P., K.M. Choe, Y. Lu, and K.V. Anderson. 2001. *Drosophila* immunity: genes on the third chromosome required for the response to bacterial infection. *Genetics*. 159:189-199.

Wu, X., L. Yen, L. Irwin, C. Sweeney, and K.L. Carraway, 3rd. 2004. Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. *Molecular and cellular biology*. 24:7748-7757.

Xu, Z., N.V. Kukekov, and L.A. Greene. 2003. POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis. *The EMBO journal*. 22:252-261.

Yang, J., and R. Steward. 1997. A multimeric complex and the nuclear targeting of the *Drosophila* Rel protein Dorsal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:14524-14529.

Yano, T., S. Mita, H. Ohmori, Y. Oshima, Y. Fujimoto, R. Ueda, H. Takada, W.E. Goldman, K. Fukase, N. Silverman, T. Yoshimori, and S. Kurata. 2008. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nature immunology*. 9:908-916.

Yao, T., and R.E. Cohen. 2002. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*. 419:403-407.

## Références bibliographiques

---

Yoshida, H., K. Kinoshita, and M. Ashida. 1996. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of biological chemistry*. 271:13854-13860.

Yount, N.Y., and M.R. Yeaman. 2013. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1277:127-138.

Zaidman-Remy, A., M. Herve, M. Poidevin, S. Pili-Floury, M.S. Kim, D. Blanot, B.H. Oh, R. Ueda, D. Mengin-Lecreux, and B. Lemaitre. 2006. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity*. 24:463-473.

Zerial, M., and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:107-117.

Zettervall, C.J., I. Anderl, M.J. Williams, R. Palmer, E. Kurucz, I. Ando, and D. Hultmark. 2004. A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:14192-14197.

Zheng, N., B.A. Schulman, L. Song, J.J. Miller, P.D. Jeffrey, P. Wang, C. Chu, D.M. Koepp, S.J. Elledge, M. Pagano, R.C. Conaway, J.W. Conaway, J.W. Harper, and N.P. Pavletich. 2002. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*. 416:703-709.

Zhou, H., D.M. Monack, N. Kayagaki, I. Wertz, J. Yin, B. Wolf, and V.M. Dixit. 2005a. *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF- $\kappa$ B activation. *The Journal of experimental medicine*. 202:1327-1332.

Zhou, H., I. Wertz, K. O'Rourke, M. Ultsch, S. Seshagiri, M. Eby, W. Xiao, and V.M. Dixit. 2004. Bcl10 activates the NF- $\kappa$ B pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature*. 427:167-171.

Zhou, R., N. Silverman, M. Hong, D.S. Liao, Y. Chung, Z.J. Chen, and T. Maniatis. 2005b. The role of ubiquitination in *Drosophila* innate immunity. *The Journal of biological chemistry*. 280:34048-34055.

Zhuang, M., S. Guan, H. Wang, A.L. Burlingame, and J.A. Wells. 2013. Substrates of IAP ubiquitin ligases identified with a designed orthogonal E3 ligase, the NEDDylator. *Molecular cell*. 49:273-282.

Zuk, P.A., and L.A. Elferink. 2000. Rab15 differentially regulates early endocytic trafficking. *The Journal of biological chemistry*. 275:26754-26764.

Engel, E. 2009. Identification des «Ubiquitin Specific Proteases» impliquées dans la régulation des voies de l'immunité chez la drosophile. *Thèse de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I, Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant*.

# Annexes

---



## **Annexe 1. Protocole d'immunofluorescence pour suivre l'internalisation du récepteur PGRP-LC**

### **ensemencement (J0) :**

- Déposer une lamelle stérile au fond des puits d'une plaque 4 puits. Penser à prévoir au moins une plaque par condition d'internalisation différente.
- Traitement des lamelles à la poly-lysine (pour faire adhérer les cellules S2) : Ajouter 500 µl de poly-lysine 0,001% (solution commerciale à 0,01% à diluer au 1/10<sup>e</sup> dans de l'eau stérile). Incuber les plaques à 37°C pendant, au moins, 5 minutes. Enlever la poly-lysine et faire un lavage au PBS 1X stérile. Laisser sécher les lamelles sous la hotte.
- Ajouter 500 µl par puits d'une solution à 10<sup>6</sup> cellules/ml
- Incubation 24h à 25°C

### **Transfection (J1) :**

- Enlever le milieu et ajouter à chaque puits : 2 µl de transfectine + 50 ng de plasmide total + 2 µg de RNAi si nécessaire + 100 µl de DSM. Trois réplicats par condition de transfection.
- Incubation 5-6h à 25°C
- Ajouter 400 µl de sérum 15% par puits
- Incubation à 25°C sur la nuit (si pas de RNAi) ou pendant 48h (si présence de RNAi)

### **IF (J2) : rester à 4°C (chambre froide)**

- Se mettre à 4°C (chambre froide du labo) et enlever le surnageant des cellules. On peut supposer que la saturation n'est pas nécessaire car les cellules sont déjà dans du sérum.
- Ajouter 300 µl d'**anticorps primaire** froid dilué dans le **DSM+ Sérum 10%** (anti-V5 dilué au 500<sup>e</sup>) pour garder les cellules vivantes.
- Incubation à 4°C pour bloquer l'endocytose et, ensuite, incubation à 25°C pour la série correspondante. Le temps d'incubation à 25°C varie pour obtenir une cinétique d'internalisation et la durée totale d'incubation avec l'anticorps primaire est d'une heure.

- Trois **lavages** successifs au PBS 1X froid (sans tween car peut troubler les cellules). Incubation pendant 10 minutes à 4°C, avec agitation.
- **Fixation** : mettre 300 µl/puits de PFA 4% dilué dans du PBS 1X.
- Incuber 10 minutes à température ambiante sans agitation
- Enlever le liquide sous la sorbonne avec une pipette car le PFA est toxique
- **3 lavages successifs** au PBS 1X : 500 µl/puits, agitation 2-3 minutes à température ambiante, puis on enlève le liquide et on recommence... (au premier lavage, enlever le liquide sous hotte avec pipette car il reste des traces de PFA. Pour les 2 autres lavages, enlever avec pompe sous-vide à la paillasse).

A partir de maintenant, **protéger la plaque de la lumière** à cause des anticorps secondaires et du Hoechst

- Ajouter 300 µl/puits **d'anticorps secondaire** anti-mouse alexa 488 dilué au 1/1000<sup>e</sup> (pour cellules) dans du sérum de cheval 5% PBS 1X. Incubation 1 heure à température ambiante, avec agitation. **Marquage de PGRP-LC membranaire**.
- Trois **lavages** successifs avec 500 µl/puits de PBS 1X. Agitation et incubation à RT pendant 10 minutes entre chaque lavage.
- **Perméabilisation** : ajouter 500 µl/puits de Triton 100X 0,5% dans du PBS 1X. Incuber à RT sous légère agitation pendant 5'.
- **3 lavages successifs** au PBS 1X avec 500 µl/puits, agitation 2-3 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl/puits **d'anticorps secondaire** anti-mouse cyanine 3 dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans du sérum de cheval 5% PBS 1X. Incubation 1 heure à température ambiante, avec agitation. **Marquage de PGRP-LC membranaire et internalisé**.
- Trois **lavages** successifs avec 500 µl/puits de PBS 1X tween 0,1%. Agitation et incubation à RT pendant 10 minutes entre chaque lavage.
- **Coloration du noyau** avec du Hoechst dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans du PBS 1X (300 µl/puits). Incubation pendant 5 minutes à température ambiante, sans agitation. Ne surtout pas laver après le Hoechst.
- **Montage lame-lamelle** dans le milieu de montage Dako
- **Observation par microscopie confocale**

## **Annexe 2. Protocole pour la quantification de l'internalisation de PGRP-LC par cytométrie**

### **ensemencement (J0) :**

- Dans une plaque 12 puits, ajouter 1 ml/ puits d'une solution à  $4.10^6$  cellules/ml
- Incubation 24h à 25°C

Prévoir, au moins, les témoins suivants:

- Témoin de cellules non transfectées (sans anticorps primaire et sans anticorps secondaire)
- Témoin cellules transfectées avec que les secondaires (sans primaire)

### **Transfection (J1) :**

- Enlever le milieu et ajouter à chaque puits : 4 µl de transfectine + 100 ng de plasmide total + 4 µl de RNAi (si nécessaire) + 200 µl de DSM
- Incubation 5-6h à 25°C
- Ajouter 800 µl de sérum 15% par puits
- Incubation à 25°C sur la nuit (si pas de RNAi) ou pendant 48h (si présence de RNAi)

### **Préparation des échantillons pour le FACS (J2) : rester à 4°C (chambre froide)**

Le FACS à disposition ne lit pas bien la Cyanine 3 (on peut prendre la flichorinitrine, PE-Cyanine 5 ou la Cyanine 5 à la place). J'ai donc choisi la Cyanine 5 pour marquer PGRP-LC après perméabilisation des cellules.

- Enlever le milieu et ajouter 300µl d'**anticorps primaire** froid dilué dans le **DSM+ Sérum 10%** (anti-V5 dilué au 500°) pour garder les cellules vivantes. Pour les témoins négatifs, ne mettre que du Sérum 10% dans DSM (sans anticorps primaire).
- Incubation à 4°C pour bloquer l'endocytose et, ensuite, incubation à 25°C pour la série correspondante. Le temps d'incubation à 25°C varie pour obtenir une cinétique d'internalisation et la durée totale d'incubation avec l'anticorps primaire est d'une heure.
- Reprendre les cellules avec ces 300 µl d'anticorps, flucher et transvaser dans une plaque 96 puits, à fond arrondi. Centrifuger 5 minutes à 1200 rpm et enlever le

surnageant en retournant la plaque d'un coup sec au-dessus de l'évier et l'essuyer doucement sur un papier absorbant.

- **Un lavage** au PBS 1X froid : Ajouter 200 µl PBS 1X froid/puits (sans tween car peut troubler les cellules). Centrifuger 5 minutes à 1200 rpm et enlever le surnageant en retournant la plaque d'un coup sec au-dessus de l'évier et l'essuyer doucement sur un papier absorbant.
- **Fixation** : mettre 100 µl/puits de PFA 4% dans du PBS 1X.
- Incuber 10 minutes à température ambiante sans agitation.
- **Un lavage** au PBS 1X : Ajouter 200 µl de PBS par-dessus la PFA. Centrifuger 5 minutes à 1200 rpm et enlever le surnageant en retournant la plaque d'un coup sec au-dessus de l'évier et l'essuyer doucement sur un papier absorbant.

A partir de maintenant, **protéger la plaque de la lumière** à cause des anticorps secondaires

- Reprendre les cellules par 100 µl/puits **d'anticorps secondaire** anti-mouse Alexa 488 dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans du sérum de cheval 5% PBS 1X ou 100 µl/puits de PBS sérum de cheval 5% pour les témoins sans anticorps membranaire. Incubation 30 minutes à température ambiante, avec agitation. **Marquage de PGRP-LC membranaire**.
- **Un lavage** au PBS 1X : Ajouter 200 µl PBS 1X/puits par-dessus l'anticorps (sans tween car peut troubler les cellules). Centrifuger 5 minutes à 1200 rpm et enlever le surnageant en retournant la plaque d'un coup sec au-dessus de l'évier et l'essuyer doucement sur un papier absorbant.
- **Perméabilisation** : ajouter 200 µl/puits de Triton 100X à 0,5% dans du PBS. Incuber à RT sous légère agitation pendant 5'. Centrifuger 5 minutes à 1200 rpm et enlever le surnageant en retournant la plaque d'un coup sec au-dessus de l'évier et l'essuyer doucement sur un papier absorbant.
- **Un lavage** au PBS 1X (sans tween car peut troubler les cellules). Ajouter 200 µl/puits de PBS 1X. Centrifuger 5 minutes à 1200 rpm et enlever surnageant
- Ajouter 100 µl/puits **d'anticorps secondaire** anti-mouse Cyanine 5 dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans du sérum de cheval 5% PBS 1X ou 100 µl/puits de PBS sérum de cheval 5% pour les témoins sans anticorps cytoplasmique. Incubation 30 minutes à température ambiante, avec agitation. **Marquage de PGRP-LC membranaire et internalisé**.
- **Un lavage** au PBS 1X tween 0,1% : ajouter 200 µl/puits par-dessus l'anticorps. Centrifuger 5 minutes à 1200 rpm et enlever le surnageant en retournant la plaque d'un coup sec au-dessus de l'évier et l'essuyer doucement sur un papier absorbant.
- Reprendre les cellules par 300 µl de PBS 1X et mettre dans des tubes Falcon adaptés à la quantification au FACS.

### **Annexe 3. Les systèmes «UAS-GAL4» et «UAS-GAL4, GAL80ts»**

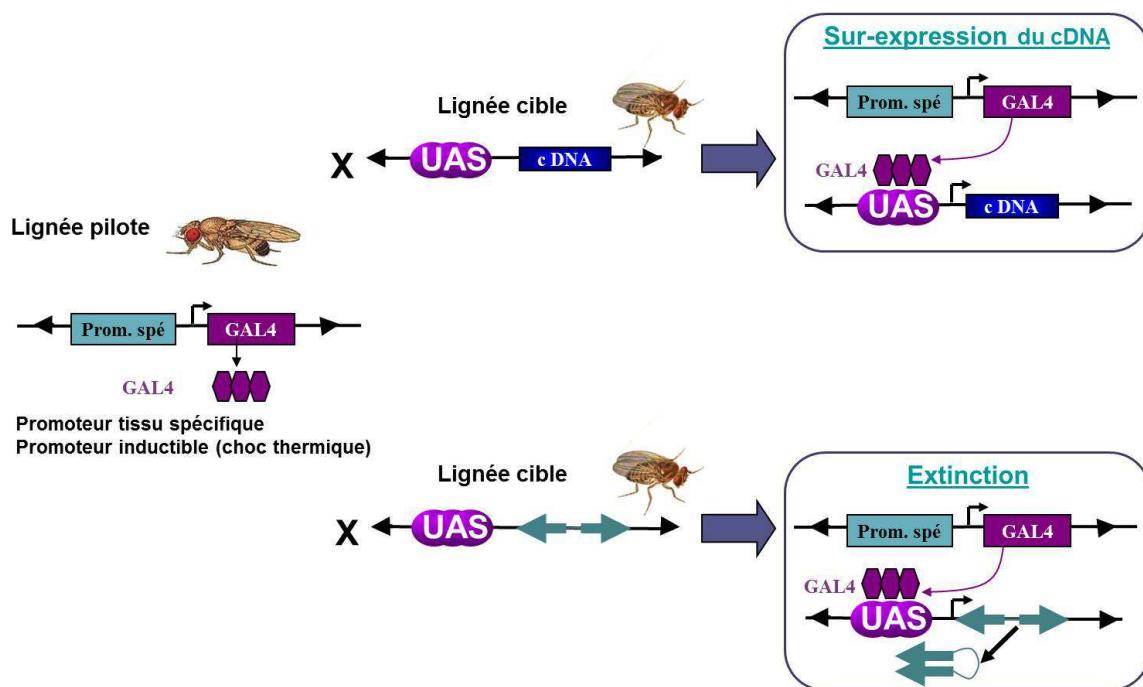
Parmi les nombreux outils génétiques mis à disposition chez la drosophile, le système «UAS-GAL4» permet d'induire ou d'éteindre un gène dans un tissu donné (les ailes, le corps gras, les hémocytes...), dans seulement quelques cellules ou de façon maîtrisée (après un choc thermique, par exemple). Ces manipulations génétiques ont été rendues possibles par l'utilisation de l'élément transposable P modifié afin de permettre l'intégration stable de gènes d'intérêts.

L'élément transposable P autonome est composé de séquences inversées répétées en 5' et 3', nommées aussi les «pieds» de l'élément P, et de quatre exons codant pour la transposase, nécessaire à la transposition et à la régulation de la mobilité de l'élément P. Un élément P non autonome ne possède pas le gène codant pour la transposase et sa mobilité ne peut se faire que si un autre élément P autonome, ou une autre source (plasmide ou élément P non mobilisable), est présent pour fournir la transposase. Les drosophilistes ont tiré profit des propriétés de l'élément P, pour insérer aléatoirement un transgène dans l'ADN chromosomique des noyaux des cellules germinales, depuis un vecteur plasmidique.

Le transgène est un élément P non autonome possédant des «pieds» en 5' et 3', de la séquence que l'on souhaite intégrer (e.g. cDNA,...) et d'un marqueur de transgénèse : typiquement les gènes *white* (w) ou *yellow* (y). Ce marqueur permet de suivre phénotypiquement l'insertion de l'élément P dans le génome dans une souche mutante  $w^{-/-}$  ou  $y^{-/-}$ . Afin de produire une lignée transgénique, deux plasmides différents sont injectés au pôle postérieur d'un œuf de drosophile âgé d'environ 1h à 1h30 (embryon au stade blastoderme syncitial avant la formation des cellules germinales). L'un des vecteurs porte le transgène et l'autre, la source de transposase. Ainsi, le transgène est intégré aléatoirement et de façon stable dans le génome de certains gamètes de l'embryon. Dans la descendance de l'adulte qui en résulte, les individus transgéniques seront sélectionnés grâce au marqueur phénotypique porté par le transgène, dans notre cas, le gène *white*, responsable de la couleur rouge des yeux de la drosophile.

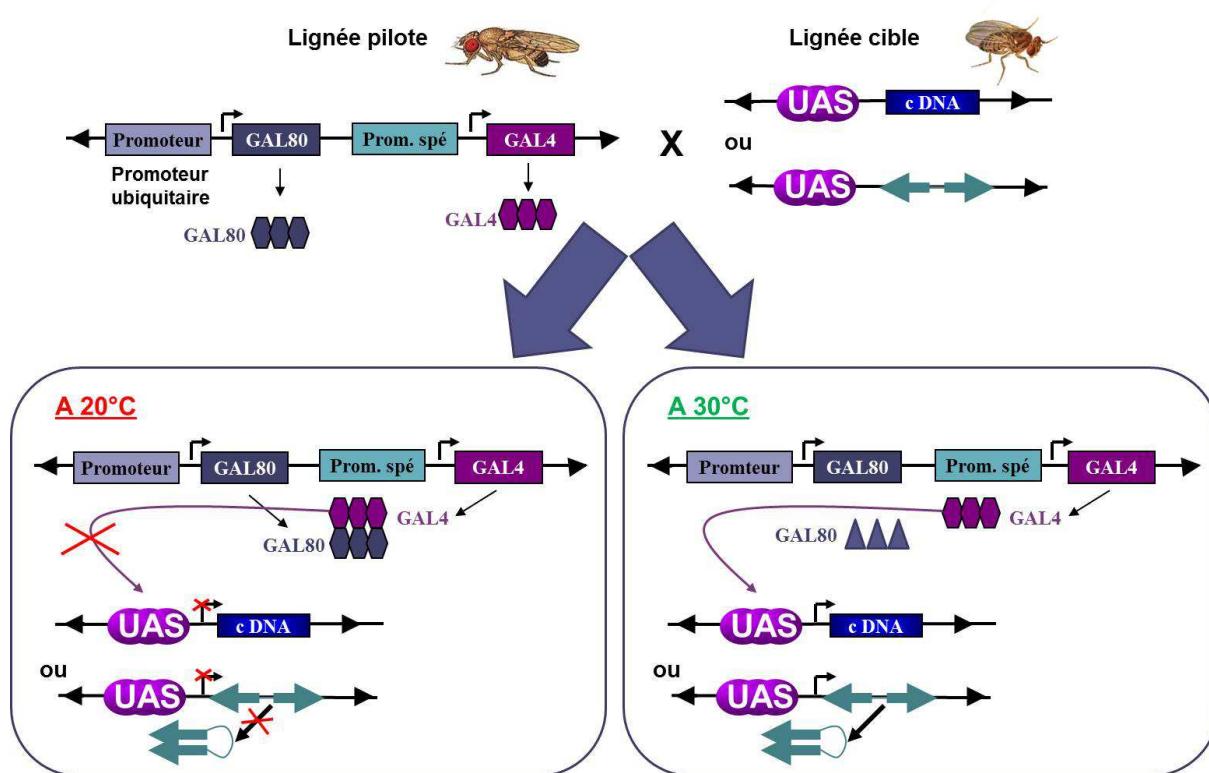
Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé le système «UAS-GAL4», qui nécessite la combinaison de deux éléments P (Brand and Perrimon, 1993) (Fig. 31). Le premier élément

$P\{GAL4\}$  possède le gène codant pour le facteur de transcription GAL4 de levure, en aval d'un promoteur de nature variable (tissu spécifique, inducible...). Le deuxième élément  $P\{UAS\text{-gène d'intérêt}\}$  porte le gène d'intérêt et les séquences régulatrices UAS reconnues par GAL4. Ainsi, le croisement d'une lignée pilote, portant  $P\{GAL4\}$ , et d'une lignée cible  $P\{UAS\text{-gène d'intérêt}\}$  permet, dans la descendance F1, l'expression du gène d'intérêt dans les mêmes conditions que celle de *Gal4*. Le gène d'intérêt peut être un cDNA, qui va alors être sur-exprimé, ou des séquences inversées répétées spécifiques, qui vont permettre l'extinction génique d'un gène cible. Il existe également des banques de lignées où l'élément  $P\{UAS\}$  inséré en amont d'un gène endogène permet l'expression du gène en présence de GAL4.



**Figure 31. Le système «UAS-GAL4».** La lignée pilote comprend le gène codant pour la protéine GAL4 de levure, sous la régulation d'un promoteur spécifique (tissu-spécifique ou inducible). La lignée cible possède le cDNA d'un gène cible (pour la sur-expression) ou des séquences répétées inversées spécifiques (pour l'extinction génique), en aval de la séquence régulatrice UAS. Le croisement d'une lignée pilote avec une lignée cible résulte en une descendance F1 qui exprime spécifiquement GAL4. GAL4 va alors se fixer sur les séquences UAS et permettre l'expression du cDNA ou des séquences répétées inversées.

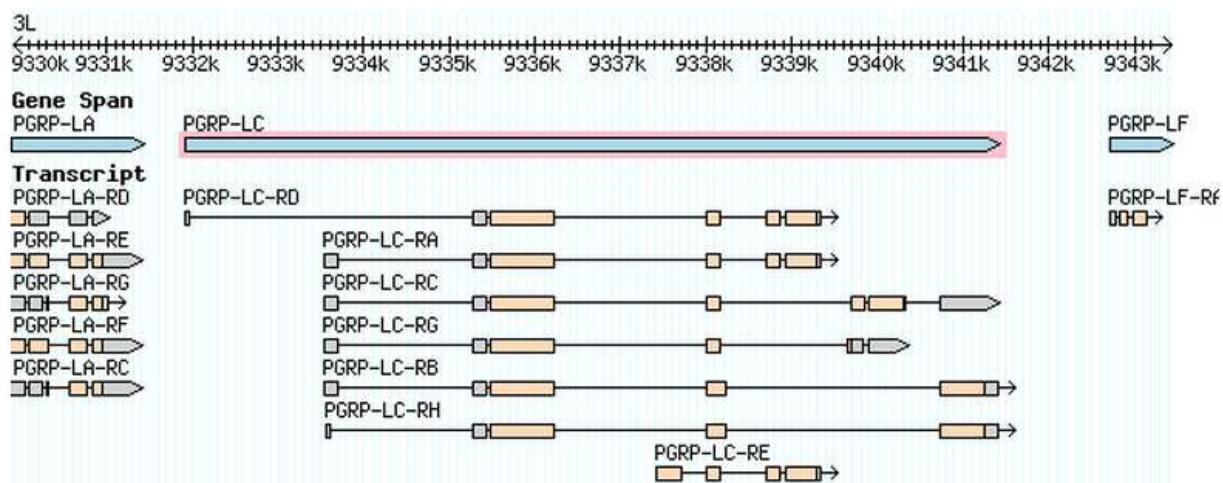
Dans certains cas, comme celui de la sur-expression de PGRP-LC, l'expression du gène d'intérêt peut être létal au stade larvaire et aucune mouche d'intérêt au stade adulte n'est obtenue. C'est pourquoi, j'ai utilisé le système «UAS-GAL4, GAL80ts», qui repose sur le fait que GAL80 inhibe réversiblement GAL4 et, donc, empêche l'expression du gène d'intérêt (Fig. 32). Comme GAL80 est thermo-sensible, sa conformation est modifiée à 30°C, il ne peut plus inhiber GAL4 et le gène d'intérêt peut être exprimé. En conséquence, il est possible d'induire l'expression du gène d'intérêt après les stades critiques du développement.



**Figure 32. Le système «UAS-GAL4, GAL80ts».** La lignée pilote comprend le gène codant pour la protéine GAL80, sous l'effet d'un promoteur ubiquitaire, et le gène codant pour la protéine GAL4 en aval d'un promoteur ubiquitaire. Dans la descendance F1, à 18°C, l'expression de GAL80 inhibe GAL4, qui ne peut plus les séquences régulatrices UAS. En revanche, à 30°C, la conformation de GAL80 est altérée et ne peut plus inhiber GAL4. La protéine GAL4 se lie alors aux séquences UAS pour induire l'expression du cDNA (pour la sur-expression) ou des séquences répétées inversées (pour l'extinction génique).

#### Annexe 4. Les transcrits du gène *PGRP-LC* et la séquence protéique de PGRP-LC RA (ou PGRP-LCx)

Carte des transcrits de PGRP-LC (CG4432) : d'après le site <http://flybase.org/>



**Figure 33. Carte des transcrits du gène *PGRP-LC* (CG4432).** L'épissage alternatif du gène PGRP-LC résulte en sept transcrits. Le transcrit PGRP-LC-RA correspond à l'isoforme PGRP-LCx, qui reconnaît, lorsqu'il oligomérise, les PGN multimériques. Le transcrit PGRP-LC-RB est l'isoforme PGRP-LCa, qui n'est actif que s'il est associé à PGRP-LCx pour la reconnaissance des PGN monomérique. Le transcrit PGRP-LC-RC correspond à l'isoforme inactif PGRP-LCy. (Schmidt et al., 2008; Steiner, 2004; Werner et al., 2003) (<http://flybase.org/>)

**Séquence protéique de PGRP-LC RA (ou PGRP-LCx) et prédition des lysines (K) ubiquitinées :**

N-ter MPFSNETEMSQCSNA**K**RRVNDPLTGP**K**NCSTSSTDGVILNDNVAAFRPE**K**ET  
**K**DRGTGEGQFQSK**SEEK**TES**K**RISVEHTVNITTEVG**K**TSSPAVSIRSTTISVVSIDD**N**  
 AIDSSSIDSDSEAEAEADYTVQ**K**LGHQVTYPPNSSHRLDLNQGLTVISRHVAPGEAAVP  
 PPNPLEAGIVAKQILNGNLAVATPTSPAGGATQQGIGSIALTNSTDVTFGDKHFYEGPVT  
 IQQFLIDNRDKW**K**PGEGPAGGQDNPAFNGGPSTNGSAPGS**K**HEDPAQTTPICPFLPNT  
 VGRKAV**T**TVVFVTLTFLLGIVLAT**T**NLFGKTLNQTDLDVIDNSTLVILKVAEWGG  
 RPAKRLMLDAQQLPINRVVISHTAAEGCESREVCSARVNQSFHMDSWGWDHIGYN  
 FLVGGDGRVYEGRGWDYVGAHTKGYNRGSIGISFIGTFTTRKPNERQLEACQLLLQE  
 GVRLKKLTTNYRLYGHQRQLSATESPGEELYKIIKKWPHWSHEI C-ter

Légende :

**Domaine cytoplasmique** (commune pour les isoformes PGRP-LCa, y et x) 293 aa

**Domaine transmembranaire** (commune pour les isoformes PGRP-LCa, y et x) 20 aa

**Domaine extracellulaire** 187 aa

**K : Lysine très probablement ubiquitinée (Score > 0,85)**

**K : Lysine probablement ubiquitinée (0,70 < Score < 0,85)**

**Figure 34. Séquence protéique de PGRP-LCx.** Le domaine cytoplasmique est surligné en gris, le domaine transmembranaire en vert et l'ectodomaine en jaune. Les lysines (K) très probablement ubiquitinées sont en rouge et celles probablement ubiquitinées en orange (d'après le site UbPred.org). Abréviations : acides aminés (aa)

**Annexe 5. Taillebourg *et al.*, 2012.**

Dans cet article, j'ai contribué principalement, dans le cadre d'un stage et de façon moindre au cours de ma thèse, à la mise au point du protocole d'immunofluorescence sur le corps gras larvaire. C'est pourquoi, j'ai fait le choix de placer cet article en annexe.

**The deubiquitinating enzyme USP36 controls selective autophagy activation by ubiquitinated proteins.**

Emmanuel Taillebourg, Isabel Gregoire, Perrine Viargues, Anne-Claire Jacomin, Dominique Thevenon, Mathias Faure and Marie-Odile Fauvarque. (2012). *Autophagy*, 8:5, 767-779

# The deubiquitinating enzyme USP36 controls selective autophagy activation by ubiquitinated proteins

Emmanuel Taillebourg,<sup>1,2,3,\*</sup> Isabel Gregoire,<sup>4,5,6</sup> Perrine Viargues,<sup>1,2,3</sup> Anne-Claire Jacomin,<sup>1,2,3</sup> Dominique Thevenon,<sup>1,2,3</sup> Mathias Faure<sup>4,5,6</sup> and Marie-Odile Fauvarque<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>CEA; DSV; iRTSV; Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant; Laboratoire de Biologie à Grande Echelle; Grenoble, France; <sup>2</sup>INSERM U1038; Grenoble, France; <sup>3</sup>Université Joseph Fourier-Grenoble I; Grenoble, France; <sup>4</sup>Université de Lyon; Lyon, France; <sup>5</sup>INSERM; U851; Lyon, France; <sup>6</sup>Université Lyon1; Lyon, France

**Keywords:** autophagy, p62, ubiquitin, deubiquitinase, DUB, deubiquitinating enzyme, cell growth

Initially described as a nonspecific degradation process induced upon starvation, autophagy is now known also to be involved in the degradation of specific ubiquitinated substrates such as mitochondria, bacteria and aggregated proteins, ensuring crucial functions in cell physiology and immunity. We report here that the deubiquitinating enzyme USP36 controls selective autophagy activation in *Drosophila* and in human cells. We show that *dUsp36* loss of function autonomously inhibits cell growth while activating autophagy. Despite the phenotypic similarity, *dUsp36* is not part of the TOR signaling pathway. Autophagy induced by *dUsp36* loss of function depends on p62/SQSTM1, an adaptor for delivering cargo marked by polyubiquitin to autophagosomes. Consistent with p62 requirement, *dUsp36* mutant cells display nuclear aggregates of ubiquitinated proteins, including Histone H2B, and cytoplasmic ubiquitinated proteins; the latter are eliminated by autophagy. Importantly, USP36 function in p62-dependent selective autophagy is conserved in human cells. Our work identifies a novel, crucial role for a deubiquitinating enzyme in selective autophagy.

## Do not distribute

### Introduction

Autophagy is a generic term, which describes the lysosomal degradation of cytoplasmic material. Three different types of autophagy occur: (1) macroautophagy, in which autophagosomes engulf portions of cytoplasm and eventually fuse with lysosomes; (2) microautophagy, in which lysosomes directly sequester cytosolic components; and (3) chaperone-mediated autophagy, in which unfolded proteins are translocated to lysosomes. Macroautophagy, hereafter referred to as autophagy, is the major lysosomal degradation pathway in cells. It is involved in several physiological and pathological processes such as cellular homeostasis, cell survival, development, neurodegeneration, cancer and defense against infections.<sup>1,2</sup> Originally described as a nonspecific degradation process limited to bulk cytosol in response to starvation, recent research has identified selective autophagy pathways for the targeting of specific substrates to autophagy, including senescent organelles, bacteria, viral proteins and aggregated proteins.<sup>3–7</sup>

The overall molecular mechanisms of autophagy are relatively well understood, due to the discovery of yeast autophagy-related genes (*atg*) and the core autophagy machinery in all eukaryotic cells from yeast to humans.<sup>8,9</sup> During autophagy, a phagophore is formed under the control of the autophagosome formation complex which includes the class III P(I)3-kinase (VPS34) and

BECLIN 1 (the ortholog of yeast ATG6).<sup>10,11</sup> Elongation of this membrane involves two conjugation systems. The first system results in the association of the cytosolic microtubule-associated protein 1 light-chain 3-I (LC3-I) with phosphatidyl-ethanolamine to generate a lipidated LC3-II form. The second system forms the ATG12–ATG5–ATG16 macromolecular complexes. Both conjugation systems contribute to the completion of the double-membrane-containing autophagosomes which then fuse with lysosomes to generate the degradative single-membraned autolysosomes.

Autophagy is induced upon starvation through a pathway dependent on the TOR (target of rapamycin) kinase.<sup>12,13</sup> Under nutrient-rich conditions, the TOR pathway is activated, which prevents activation of the Ser/Thr kinase ATG1 in yeast or ULK1/2 (the orthologs of ATG1) in mammalian cells. Nutrient privation and rapamycin treatment downregulate TOR kinase activity, which results in activation of the ATG1 kinase to induce autophagy.

Recent studies identified ubiquitination as a key signal for selective autophagy. Ubiquitin functions as a tag targeting protein aggregates, bacteria and mitochondria to autophagic degradation.<sup>14</sup> The first evidence for the role of ubiquitination in autophagy came from the p62/SQSTM1 protein identified as an adaptor for delivering cargo marked by polyubiquitin to autophagosomes.<sup>15,16</sup> p62/SQSTM1 binds to polyubiquitinated

\*Correspondence to: Emmanuel Taillebourg or Marie-Odile Fauvarque; Email: emmanuel.taillebourg@cea.fr or mofauvarque@cea.fr  
Submitted: 06/16/11; Revised: 01/12/12; Accepted: 01/16/12  
<http://dx.doi.org/10.4161/auto.19381>

protein cargo via a ubiquitin-associated (UBA) domain and to the autophagy machinery via a LC3-interacting region (LIR). It thus functions as a bridge between polyubiquitinated cargo and autophagosomes. Two other proteins, NDP52 and NBR1, were described later, and found to have similar functions to p62/SQSTM1.<sup>17,18</sup> Recently ALFY (autophagy-linked FYVE domain) was shown to orchestrate the assembly of autophagosomes to p62/SQSTM1-captured cargo by binding to phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3)P), ATG12-ATG5-ATG16 complex, LC3 and p62.<sup>19,20</sup>

The mechanisms responsible for the ubiquitination of specific autophagy substrates remain largely unknown except for mitochondria, which have been shown to be polyubiquitinated on VDAC1 by the PARKIN E3 ubiquitin ligase.<sup>21</sup> It is likely that ubiquitination of other substrates for selective autophagy is achieved by specific, unknown E3 ligases and highly regulated by deubiquitinating enzymes. These enzymes remove ubiquitin residues from ubiquitinated substrates and function as antagonists of E3 ligases.<sup>22</sup> Some of them may regulate the ubiquitination status of selective autophagy substrates. We previously demonstrated that in *Drosophila* the deubiquitinating enzyme dUSP36 acts as a negative regulator of the NF $\kappa$ B dependent *immune deficiency* (*imd*) pathway and deubiquitinates the IMD protein.<sup>23</sup> *dUsp36* (also known as *emperor's thumb* and *scrawny*) was independently shown to be required for apoptosis regulation<sup>24</sup> and for stem cells maintenance through deubiquitination of the Histone H2B protein.<sup>25</sup> We report here that *dUsp36* loss of function inhibits cell growth and activates autophagy. Although these phenotypes are the hallmark of TOR pathway mutants, we show that *dUsp36* is not part of this signaling pathway. Autophagy induced by *dUsp36* loss of function is not the cause of the observed growth defects and strictly depends on the p62 adaptor protein. This suggests that dUSP36 prevents the induction of selective ubiquitin-mediated autophagy. Accordingly, *dUsp36* inactivation results in nuclear aggregates of ubiquitinated proteins, including ubiquitinated Histone H2B. Cytoplasmic ubiquitinated aggregates are also formed during *dUsp36* inactivation, and eliminated by autophagy. This USP36 requirement to prevent selective autophagy is conserved in human cells: silencing of hUSP36 triggers autophagy via a p62-dependent pathway. Our work identifies for the first time a crucial role for a deubiquitinating enzyme in selective autophagy inhibition.

## Results

***Usp36* loss of function inhibits larval growth and activates autophagy.** We previously reported that *dUsp36* null mutants are lethal at larval stages.<sup>23</sup> To examine the cause of this lethality, larvae homozygous for a null *dUsp36* mutation<sup>23</sup> were collected. Compared with wild-type larvae (Fig. 1A, left), mutant larvae displayed a significantly reduced size without gross morphological defects (Fig. 1A, middle), and eventually died, 5 d after egg laying (AEL). Larval length measurements at different time points after hatching showed that *dUsp36* mutant larvae grew more slowly than wild-type larvae (Fig. 1B). This growth defect is specific to *dUsp36* loss of function mutants since

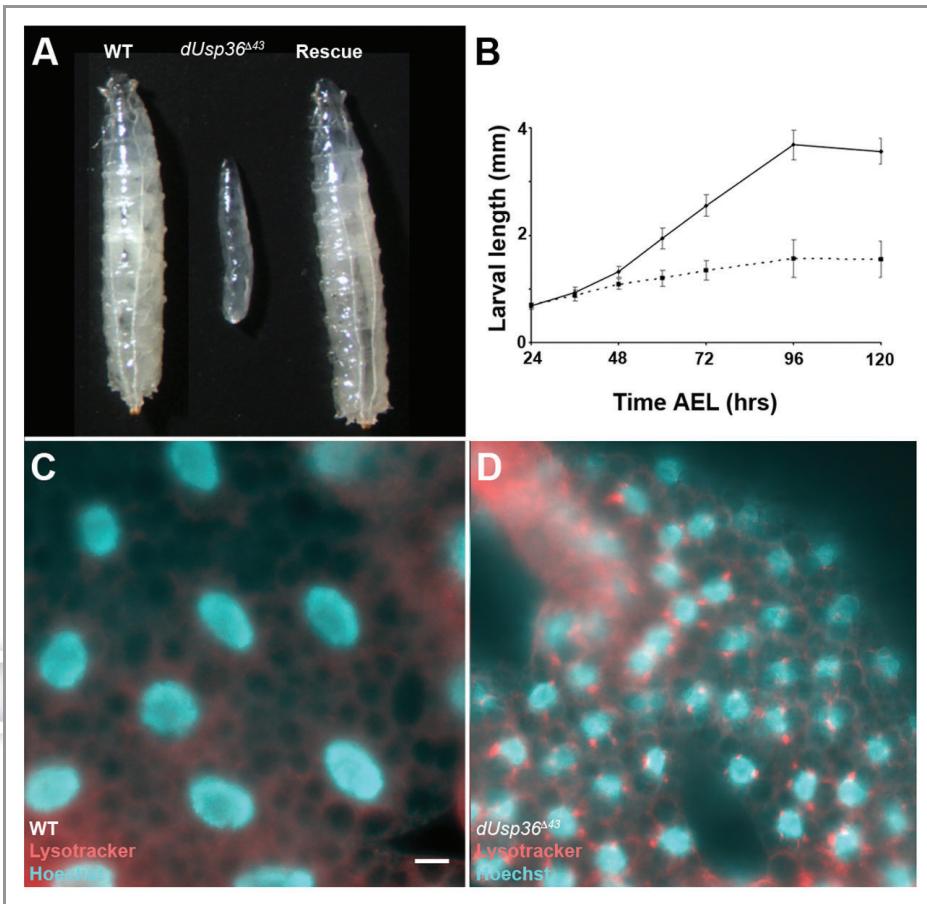
it can be completely rescued by ubiquitous expression of the *dUsp36* protein (Fig. 1A, right).

Constitutive activation of autophagy has been reported to cause growth defects in larvae.<sup>26</sup> Thus, we monitored autophagy by staining the larval fat body with the Lysotracker Red dye that identifies acidified lysosomes and autolysosomes.<sup>13</sup> Due to the low baseline level of lysosomal activity in well-fed early third instar larvae (4 d AEL), this dye did not accumulate in fat body cells of wild-type larvae (Fig. 1C). However, in age-matched *dUsp36* mutant larvae, numerous acidified lysosomes were observed in the fat body cells suggesting robust autophagy activity (Fig. 1D).

***dUsp36* function is cell autonomous.** We next asked whether the role dUSP36 plays in cell growth and autophagy is cell autonomous. We induced clones of *dUsp36* null mutant fat body cells using the MARCM system,<sup>27</sup> which enables the targeted expression of transgenes in cells that have undergone mitotic recombination. In a first set of experiments, we generated homozygous *dUsp36* null mutant cells that expressed nuclear GFP. These cells were much smaller than their heterozygous neighbors (relative cell size = 0.09, Fig. 2A and F) and were positive for LysoTracker staining (Fig. 2B). In a second set of experiments, we modified MARCM to allow for the expression of the GFP-LC3 reporter gene following mitotic recombination.<sup>28</sup> This reporter encodes a fusion protein between green fluorescent protein and human LC3.<sup>29</sup> The expression of GFP-LC3 is diffused in the cytoplasm when autophagy is not induced. However GFP-LC3 is recruited to autophagosomes upon autophagy induction by starvation or rapamycin treatment.<sup>13</sup> This experiment revealed that, in mid third instar larvae, 96% of *dUsp36* null mutant cells contained autophagosomes compared with 3% of wild-type cells (n = 49 and 69 cells, respectively; p < 0.0001, Fig. 2C and E). Finally, MARCM induced expression of the dUSP36 protein in *dUsp36* mutant cells restored cell size and autophagy to wild-type levels (Fig. 2D–F). We have also performed clonal analysis in the wing imaginal disc and observed that *dUsp36* mutant clones are smaller than wild-type clones (Fig. S1), indicating that *dUsp36* function is also required in mitotic tissues. Taken together, these results clearly demonstrate that the deubiquitinating enzyme dUSP36 is required cell autonomously to promote cell growth and/or proliferation and to prevent autophagy activation.

**dUSP36 does not function in the TOR pathway.** In *Drosophila*, inhibition of the TOR pathway, either by rapamycin treatment or genetic mutations prevents cell growth and activates autophagy.<sup>13,30</sup> The TOR kinase independently controls cell growth partly through the S6 Kinase (S6K) and autophagy through the ATG1 kinase. The phenotypic similarities between TOR and *dUsp36* loss of functions suggested that both proteins may be involved in the same signaling pathway, and that dUSP36 may act upstream or at the level of TOR.

As a readout of TOR pathway activity we first monitored the levels of active phosphorylated S6K (P-S6K) in age-matched larvae (Fig. S2A). In young second instar (48 h AEL) larvae we observe no difference between control and *dUsp36* silenced larvae whereas a decrease in P-S6K is observed in mid-L2 (60 h AEL) *dUsp36* silenced larvae. We think that this late decrease is a consequence



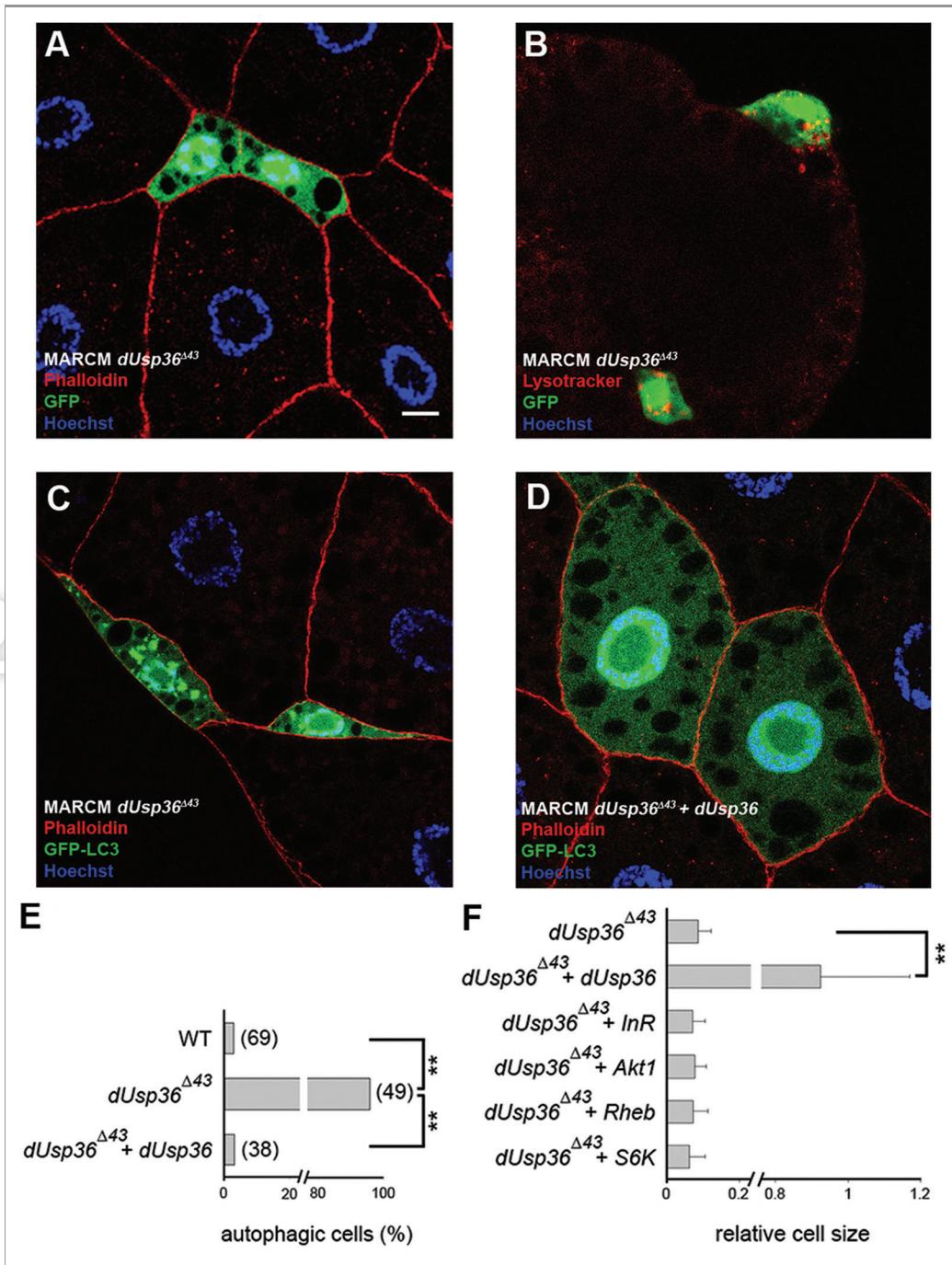
**Figure 1.** *dUsp36* null mutation impairs organismal growth and activates autophagy. (A) Wild-type (left), *dUsp36* null mutant (middle, *dUsp36*<sup>Δ43</sup>/*dUsp36*<sup>Δ43</sup>) and rescued (right, *UAS-dUsp36*<sup>+/</sup>; *daGal*, *dUsp36*<sup>Δ43</sup>/*dUsp36*<sup>Δ43</sup>) larvae. (B) Larval length measurements at different time points. Continuous line: wild-type larvae, dotted line: *dUsp36* null mutant larvae. Fluorescent microscope imaging of unfixed fat bodies from wild-type (C) or *dUsp36* null mutant larvae stained with Lysotracker Red (red) and Hoechst 33342 (blue). Scale bar: 10  $\mu$ m.

of the growth inhibition; indeed, a decrease in P-S6K is also observed by inhibiting the dATAD3A mitochondrial protein,<sup>31</sup> which is required for cell growth independently of the TOR pathway. Furthermore comparison of P-S6K levels between 48 h AEL control larvae and 60 h AEL *dUsp36* silenced larvae (which have approximately the same size) does not display significant differences. These results thus suggest that *dUsp36* loss of function does not directly inhibit the TOR pathway.

In order to get functional data we expressed various activators of the TOR pathway in *dUsp36* mutant cells by MARCM and examined their ability to rescue *dUsp36* phenotypes. We expressed insulin receptor (InR), AKT1 or RHEB proteins, each of which is sufficient to activate the TOR pathway and to increase cell size.<sup>13,32</sup> Strikingly, none of these proteins rescued the size defects of *dUsp36* mutant cells indicating that dUSP36 does not act upstream of RHEB, the most downstream component of the TOR pathway tested (Fig. 2F and Fig. S2C–E). Since RHEB is a direct activator of the TOR complex, these results suggest that dUSP36 may act either at the level of TOR activation or independently of the TOR pathway. Overexpression of the TOR kinase has detrimental effects<sup>33</sup> and thus could not be assayed

directly, so we attempted to rescue the *dUsp36* mutant phenotype by expressing the TOR substrate S6 Kinase (S6K). Overexpression of this kinase has been shown to partially rescue the cell growth defect of *dTOR* mutant cells.<sup>13</sup> In contrast, we observed that S6K overexpression did not rescue the cell growth defect of *dUsp36* mutant cells indicating that dUSP36 does not function upstream of S6K (Fig. 2F and Fig. S2F). Together, these results indicate that dUSP36 is not part of the TOR pathway.

**Cell growth defects and autophagy activation are not mediated by the IMD pathway.** Our previous work identified dUSP36 as a negative regulator of the IMD pathway.<sup>23</sup> We showed that dUSP36 interacts with and deubiquitinates the IMD protein. *dUsp36* silencing results in the constitutive activation of this NF $\kappa$ B dependent signaling pathway and consequently of the connected JNK pathway. Therefore, we asked whether the cell growth inhibition and autophagy activation that we observed upon *dUsp36* silencing would depend on inappropriate activation of the IMD pathway. We used the FLPout GAL4/UAS method<sup>34</sup> to clonally activate expression of the GFP-LC3 reporter and transgenes containing specific inverted repeats (IR). This induced RNAi-dependent gene silencing in



**Figure 2.** Clonal analysis of *dUsp36* function in the fat body. *dUsp36* null mutant cells expressing nuclear GFP were generated by MARCM and stained with Alexa 546-phalloidin (red) and DAPI (blue) (A) or Lysotracker Red (red) (B). MARCM was also used to express the GFP-LC3 autophagy reporter in *dUsp36* null mutant (C) and rescued cells (D). (E) Quantification of autophagy in wild-type, *dUsp36* mutant or rescued cells. Autophagy was considered to be activated in a particular cell if at least one GFP-LC3 vesicle was observed. Bracketed numbers represent the number of individual cells examined. (F) Quantification of the relative cell size of *dUsp36* mutant, rescued cells, and of *dUsp36* mutant cells expressing various members of the TOR pathway. Area measurements of mutant cells relative to surrounding wild-type cells are shown. (\*\*p < 0.001, independence chi-square test). Genotypes: (A and B) *y,w,hsFLP*+/+; *Cg-Gal4*, *UAS-GFPnls*+/+; *FRT80 dUsp36<sup>Δ43</sup>*/*FRT80 TubGal80* (C) *y,w,hsFLP*+/+; *Cg-Gal4*, *UAS-GFP-LC3*+/+; *FRT80 dUsp36<sup>Δ43</sup>*/*FRT80 TubGal80* (D) *y,w,hsFLP/UAS-dUsp36*; *Cg-Gal4*, *UAS-GFP-LC3*+/+; *FRT80 dUsp36<sup>Δ43</sup>*/*FRT80 TubGal80*. Scale bar: 10  $\mu$ m.

GFP-LC3 expressing clones. When *dUsp36-IR* transgene was used in mid third instar larvae to silence *dUsp36*, we observed localization of GFP-LC3 to autophagosomes in more than 30% of the knocked-down cells (Fig. 3B and C), compared with 96%

of the null mutant cells (Fig. 2E). This result indicates that RNAi-mediated *dUsp36* silencing results in a hypomorphic phenotype. As RNAi-induced phenotypes are known to require more time to develop, autophagy activation was also monitored in late third

instar larvae. At this developmental stage autophagy is activated in wild-type cells<sup>28</sup> and we detected autophagosomes in 20% of them (Fig. 3G). In contrast, we observed that more than 80% of the knocked-down cells contained autophagosomes (Fig. 3D and G). We also observed that *dUsp36-IR* expressing cells displayed a strong size reduction (Fig. 3D and H). These results show that silencing *dUsp36* by RNAi recapitulates the null mutant phenotype.

Co-expression of the *dUsp36-IR* transgene and of an *imd-IR* transgene, which had been previously shown to efficiently inhibit *imd* gene expression,<sup>23</sup> did not significantly modify the level of autophagy induction (Fig. 3G) or the cell size reduction (Fig. 3H), compared with cells expressing only the *dUsp36-IR* transgene. These results indicate that autophagy activation and cell growth inhibition induced by *dUsp36* silencing are not caused by the activation of the IMD pathway or the connected JNK pathway.

**Cell growth inhibition and autophagy activation.** Overexpression of the autophagy regulator ATG1 in fat body cells has been shown to strongly activate autophagy and cause cell growth inhibition.<sup>26</sup> Thus, we considered the possibility that autophagy activation in *dUsp36* mutant fat body cells might lead to the observed growth defect. To test this hypothesis, autophagy was inhibited in *dUsp36-IR* expressing cells by co-expressing an RNAi transgene targeting *Atg5*,<sup>13</sup> an obligatory component of the autophagy machinery. We observed that cells expressing *dUsp36-IR* and *Atg5-IR* showed a dramatic reduction of autophagy activity (Fig. 3E and G). This result indicates that autophagy induced by *dUsp36* silencing requires *Atg5* function. We then looked at the relative size of cells expressing *dUsp36-IR* alone or in combination with *Atg5-IR*. We found no significant differences in the size of cells (Fig. 3H). Thus, we conclude that autophagy inhibition does not significantly rescue the size of *dUsp36* silenced cells.

We also expressed the *dUsp36-IR* transgene in the fat body of wild-type or *Atg1* null mutant larvae which further confirmed that prevention of autophagy induction in *dUsp36-IR* expressing cells does not modify the cell growth defect (Fig. S3). Altogether, our findings show that the cell growth inhibition induced by *dUsp36* loss of function is not a consequence of autophagy activation.

Conversely, we asked whether cell growth inhibition per se could trigger autophagy. To this end, we inactivated the *dATAD3A/belphegor (bor)* gene<sup>35</sup> which encodes a mitochondrial protein required for cell growth.<sup>31</sup> FLPout mediated expression of an RNAi construct targeting *dATAD3A* resulted in cell size inhibition in the same range as *dUsp36* inactivation (Fig. 3H). However, none of the *dATAD3A* knockout cells showed GFP-LC3 recruitment to autophagosomes ( $n = 38$ , data not shown). This result indicates that cell growth inhibition is not sufficient to activate autophagy and suggests that dUsp36 plays a specific role in preventing autophagy activation.

**Autophagy induced by *dUsp36* inactivation requires the p62/Ref(2)P protein.** The p62 adaptor protein has been identified as a key component of selective autophagy.<sup>16</sup> The *Drosophila* *p62* homolog, *refractory to Sigma P (ref(2)P)*, shares similar functional motifs<sup>36,37</sup> and has been shown to play a major role in the formation of ubiquitin-positive protein aggregates in the *Drosophila* adult brain.<sup>38</sup> To address the question of genetic

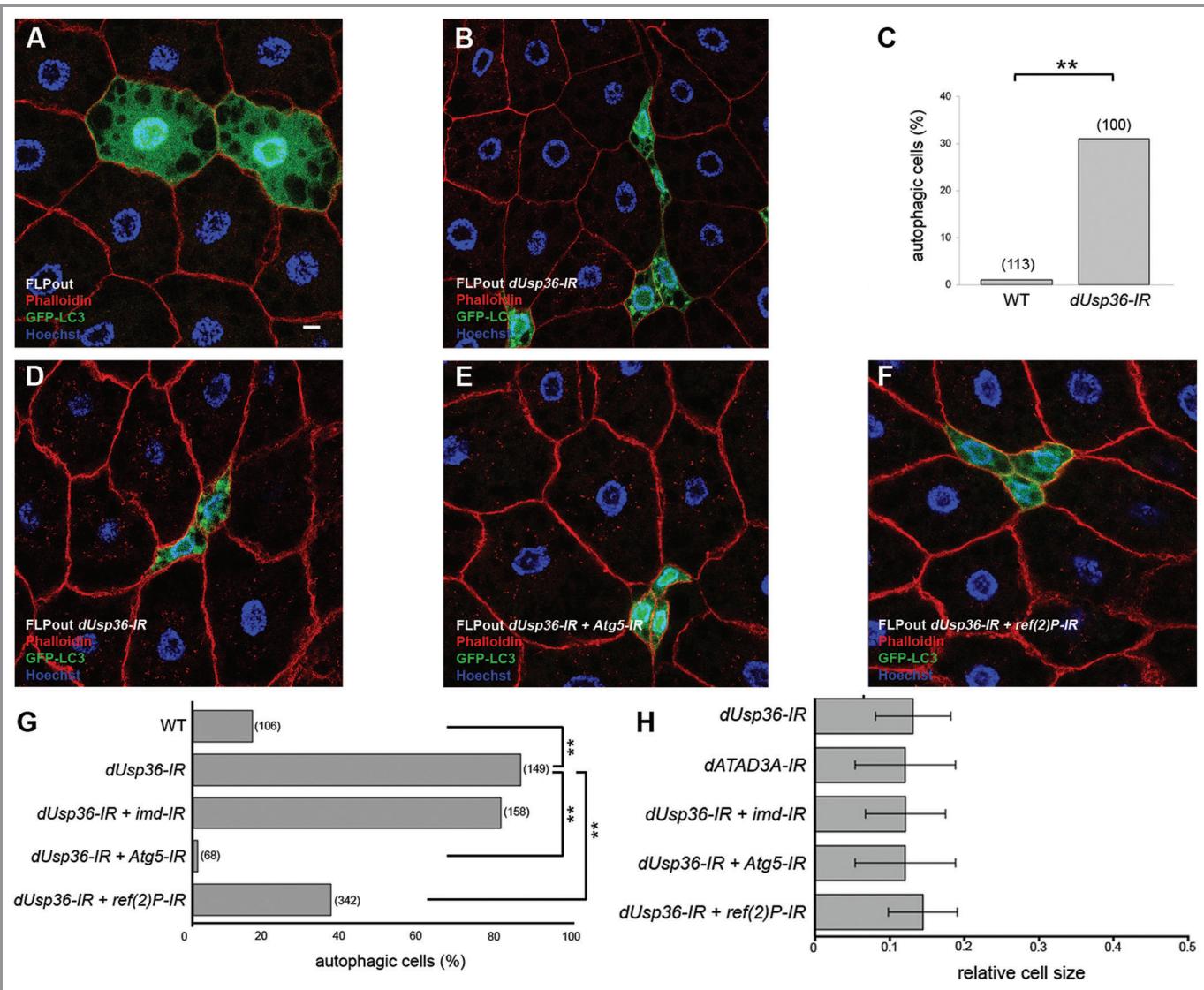
interactions between *dUsp36* and *ref(2)P*, we used two *ref(2)P* loss-of-function alleles: *ref(2)P<sup>nd2</sup>*, which lacks the PB1 domain required for multimerization and formation of protein aggregates and *ref(2)P<sup>nd3</sup>*, which lacks the UBA (ubiquitin-associated) domain required for binding to ubiquitinated proteins.<sup>39</sup> *ref(2)P* homozygous mutants are viable and do not show any developmental defects except male sterility.<sup>40</sup> Compared with wild-type larvae, *dUsp36* null larvae are developmentally delayed and, at 96 h AEL, they are in 2nd larval instar whereas wild-type larvae are in 3rd larval instar (Fig. S4). However, they do not exhibit significant larval lethality before this time point (Fig. 4A). In contrast, most of the *ref(2)P*, *dUsp36* double mutant larvae have died by 96 h AEL (Fig. 4A). This strong genetic interaction is observed with the two *ref(2)P* alleles and prompted us to investigate the role of *ref(2)P* in autophagy induced by *dUsp36* inactivation.

We first performed Lysotracker staining. The pattern of the few surviving double mutants revealed a striking difference compared with that of *dUsp36* mutant larvae (Fig. 4B and C). Double mutant fat body cells showed either a complete absence of lysosomes (Fig. 4C, arrow) or a juxta-nuclear accumulation of Lysotracker-positive structures (Fig. 4C, arrowhead). To confirm this result at the cellular level, we performed Lysotracker staining on clones of *dUsp36* null mutant cells generated either in a wild-type or in a *ref(2)P<sup>nd2</sup>* mutant background (Fig. 4D and E). The autolysosomes observed in *dUsp36* mutant cells were not present in the *ref(2)P*, *dUsp36* double mutant cells. This result suggests that the p62/Ref(2)P protein is required for autophagy in *dUsp36* mutant cells.

We then directly looked at autophagy by using the FLPout method to clonally activate expression of the GFP-LC3 reporter and of RNAi transgenes targeting *dUsp36* and/or *ref(2)P*. We observed that clones of cells co-expressing the *dUsp36-IR* and *ref(2)P-IR* transgenes showed a significant reduction of autophagy activity compared with cells expressing *dUsp36-IR* alone (Fig. 3F and G). We have also quantified autophagy in white pre-pupae, a stage during which nonselective autophagy is strongly activated in fat body cells (Fig. S5). As expected, compared with wild-type (WT) cells, *Atg5-IR* expressing cells have reduced autophagy activity. This was not the case with *ref(2)P-IR* expressing cells in which the autophagy levels are not modified. This indicates that Ref(2)P is not required for nonselective autophagy but specifically contributes to autophagy induced by *dUsp36* loss of function. Lastly the relative cell size is not significantly modified by *ref(2)P* inactivation (Fig. 3H) further indicating that cell growth defects are independent of autophagy induction in *dUsp36* mutant cells.

The role of *ref(2)P* was also confirmed in a *dUsp36* null mutant background. For this, the MARCM system was used to drive expression of GFP-LC3 and *ref(2)P-IR* in *dUsp36* null mutant cells. We observed that *ref(2)P* silencing significantly inhibited autophagy induced in *dUsp36* null mutant cells (Fig. S6). Taken together, these results show that the p62/Ref(2)P protein contributes to autophagy induced by *dUsp36* inactivation.

***dUsp36* loss of function leads to the accumulation of ubiquitinated proteins in both the nucleus and the cytoplasm.** We have shown that autophagy in *dUsp36* mutant cells is



**Figure 3.** Autophagy activation in *dUsp36* silenced cells depends on *Atg5* and *ref(2)P*. (A–C) Mid third instar larvae. Expression of the GFP-LC3 autophagy reporter was clonally activated in fat body cells alone (A) or in combination with a dsRNA transgene targeting *dUsp36* (B) using the FLPout method. (C) Quantification of autophagy in cells expressing GFP-LC3 alone (WT) or in combination with the dsRNA transgene targeting *dUsp36* (*dUsp36-IR*). (D–H) Late third instar larvae. The FLPout method was used to express the GFP-LC3 reporter and the *dUsp36-IR* transgene alone (D) or in combination with the *Atg5-IR* (E) or *ref(2)P-IR* (F) transgenes. (G) Quantification of autophagy in wild-type cells, in cells expressing the *dUsp36-IR* transgene alone, or in combination with the *imd-IR*, *Atg5-IR* or *ref(2)P-IR* transgenes. (H) Quantification of the relative cell size of cells expressing the *dATAD3A-IR* transgene or the *dUsp36-IR* transgene alone or in combination with the *imd-IR*, *Atg5-IR* or *ref(2)P-IR* transgenes. (A, B and D–F) Confocal sections of fixed fat bodies stained with GFP (green), Alexa 546-phalloidin (red) and DAPI (blue) are shown. G, H: Bracketed numbers represent the number of individual cells examined. (\*\* =  $p < 0.001$ , independence chi-square test). Genotypes: (A) *y,w,hsFLP/+; UAS-GFP-LC3/+*, *Ac > CD2 > Gal4/+* (B) *y,w,hsFLP/+; UAS-GFP-LC3/UAS-dUsp36-IR*, *Ac > CD2 > Gal4/+* (D) *y,w,hsFLP/+; UAS-GFP-LC3,UAS-dUsp36-IR/+*, *Ac > CD2 > Gal4/+* (E) *y,w,hsFLP/UAS-Atg5-IR; UAS-GFP-LC3,UAS-dUsp36-IR/+*, *Ac > CD2 > Gal4/+* (F) *y,w,hsFLP/+; UAS-GFP-LC3,UAS-dUsp36-IR/UAS-ref(2)P-IR*, *Ac > CD2 > Gal4/+*. Scale bar: 10  $\mu$ m.

dependent on the p62/Ref(2)P protein, a key component of ubiquitin-targeted autophagy. This suggests that, in the absence of the deubiquitinating enzyme dUSP36, ubiquitinylated substrates accumulate and induce selective autophagy. We found that ubiquitinylated proteins were readily detected in the nucleus of the *dUsp36* mutant cells (Fig. 5A). They formed dense dots in close association, but not colocalized with DNA. Importantly, MARCM induced expression of the dUSP36 protein in *dUsp36* mutant cells prevented the apparition of these nuclear aggregates

(Fig. 5B). This indicates that ubiquitinylated proteins accumulation results from *dUsp36* loss of function. The dUSP36 deubiquitinating enzyme has been shown to deubiquitinate the histone H2B in both Drosophila embryo and stem cells.<sup>25</sup> In accordance with a role in H2B ubiquitination, *dUsp36* mutant fat body cells accumulated ubiquitinylated H2B in their nuclei (Fig. S7). These results show that dUSP36 is required to prevent nuclear accumulation of ubiquitinylated proteins, among which the histone H2B was identified.

By contrast with the nucleus, ubiquitinated proteins were not readily observed in the cytoplasm of *dUsp36* knockout cells (Fig. 5A and C). We hypothesized that their elimination by autophagy may have prevented their detection. Indeed, autophagy inhibition using the *Atg5-IR* transgene revealed the presence of numerous ubiquitinated proteins in the cytoplasm of *dUsp36* silenced cells (Fig. 5D). Previous work showed that autophagy inhibition induced accumulation of ubiquitinated aggregates in the Drosophila<sup>38</sup> and mouse<sup>41,42</sup> central nervous system. In contrast, this was not observed in *Atg5* silenced larval fat body cells (data not shown). This indicates that the observed ubiquitinated proteins are not due to autophagy inhibition by itself, but rather to *dUsp36* loss of function. Our observations thus show that *dUsp36* loss of function results in the accumulation of ubiquitinated proteins, in both the nucleus and the cytoplasm where they are permanently eliminated by autophagy.

As we had shown that the Ref(2)P/p62 protein contributes to autophagy induced by *dUsp36* inactivation, we asked whether it accumulates in *dUsp36* mutant cells. We first addressed this point by overexpressing a Ref(2)P-GFP fusion protein in WT and *dUsp36-IR* expressing cells (Fig. 6A and B). We observed that Ref(2)P-GFP accumulates as dots in WT cells and that the size and intensity of these dots were greatly enhanced in *dUsp36* knockdown cells. To rule out the possibility that this result might be due to Ref(2)P-GFP overexpression, we then used an anti-Ref(2)P antibody to study expression of the endogenous Ref(2)P protein. In WT and *dUsp36-IR* expressing fat body cells, the Ref(2)P protein was detected at very low levels (Fig. 6C). In contrast, in cells co-expressing *dUsp36-IR* and *Atg5-IR*, larger Ref(2)P-positive dots were observed (arrows, Fig. 6D). This indicates that accumulation of ubiquitinated proteins in *dUsp36* mutant cells is correlated with accumulation of Ref(2)P and supports our conclusion that the p62/Ref(2)P protein is required to target ubiquitinated proteins induced upon *dUsp36* inactivation to autophagy degradation.

**Human USP36 is required for p62-dependent autophagy inhibition.** Human and Drosophila USP36 show 37% identity in their catalytic domain and share two conserved domains at their N and C-terminal parts.<sup>23,24</sup> The human USP36 protein was described to function in the nucleolus where it deubiquitinates fibrillarin,<sup>43</sup> but its role in autophagy is unknown. We asked whether human USP36 would also be required to prevent autophagy activation in cultured cells. We used specific short interference (si)-RNA to reduce *hUSP36* expression in GFP-LC3 HeLa cells.<sup>7</sup> We observed a drastic increase of GFP-LC3 dots, corresponding to GFP-LC3-containing autophagosomes in *siUSP36*-treated cells compared with siControl-treated cells (Fig. 7A, C and F). As observed in Drosophila, *hUSP36* inactivation does not inhibit TOR pathway activity as judged by levels of P-S6K and P-4EBP (Fig. S2B). An increase in the lipidated, autophagosome-associated form of LC3 (LC3-II) was also observed in *siUSP36*-treated cells (Fig. 7D). Reduction of *ATG5* expression was used as a control of autophagy induction and strongly prevented autophagosome formation (Fig. 7B and F). Furthermore, as observed in Drosophila, reduction of *ATG5* expression strongly prevented autophagosome formation in

*hUSP36* silenced cells (data not shown). We next determined if autophagosome detection subsequent to *siUSP36* treatment was the result of an increased autophagic flux or an accumulation of basal autophagosomes due to the inhibition of their degradation. First, we found that, in contrast to *siATG5*, *siUSP36* treatment did not lead to accumulation of endogenous p62/SQSTM1 (Fig. 7E). Next, we analyzed autophagy in the presence of baflomycin A<sub>1</sub> (BAF), an inhibitor of autolysosome acidification. We found that BAF treatment further increased the total number of GFP-LC3 puncta observed in *siUSP36*-treated cells as compared with siControl (Fig. 7G). We also observed a clear colocalization of GFP-LC3 and p62 indicating that USP36 dependent autophagy results in p62 recruitment to autophagosomes (Fig. S8A and S8B). Finally, we observed a partial colocalization of the endogenous LC3B protein with the lysosomal marker LAMP-1 (Fig. S8C and S8D) indicating that autophagosomes induced upon *hUSP36* inactivation are bona fide autophagosomes capable of fusing with lysosomes. This result strongly supports that reduced expression of USP36 induces de novo autophagosome formation.

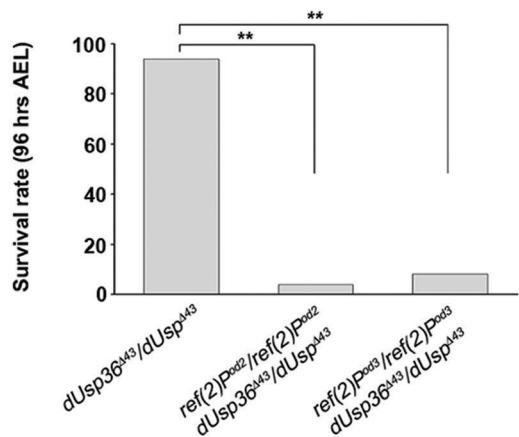
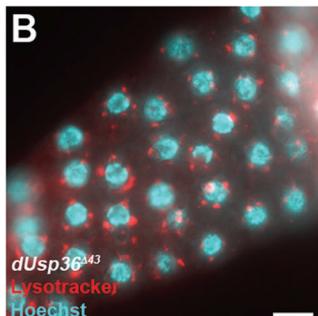
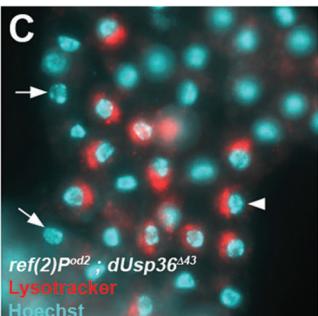
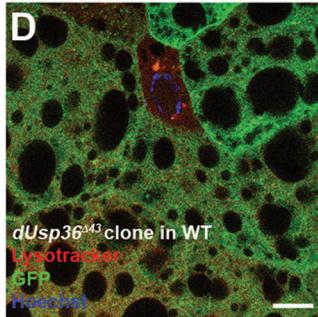
We next tested whether autophagy induced by silencing *hUSP36* depends on p62. We found that GFP-LC3 HeLa cells cotransfected with siRNAs targeting *hUSP36* and *p62* displayed reduced number of autophagosome compared with single *siUSP36*-transfected cells (Fig. 7H). Together, these results show that autophagy induction upon *hUSP36* silencing depends on the p62 protein. Thus, the function of hUSP36 in autophagy is conserved between Drosophila and human cells and relies on the expression of p62.

## Discussion

Our work identifies USP36 as a deubiquitinating enzyme that inhibits selective, p62-dependent autophagy in Drosophila and human cells and which is further required for cell growth in Drosophila.

We found very reminiscent phenotypes between *dUsp36* and *dTOR* mutants. The TOR pathway regulates autophagy induction upon starvation in human and in Drosophila cells.<sup>13</sup> This pathway has also been shown to control cell growth in Drosophila.<sup>30</sup> These similarities raised the possibility that USP36 is required for activation of the TOR pathway. However, monitoring TOR pathway activity in Drosophila larvae and in human cells did not convincingly implicate USP36 in this pathway. Moreover, in Drosophila epistasis experiments indicate that *dUSP36* is not part of the TOR pathway. Thus, our results strongly suggest that USP36 does not function in the TOR pathway.

We next considered different hypotheses to account for the growth defect of *dUsp36* mutant cells. First, *dUSP36* is a negative regulator of the IMD pathway,<sup>23</sup> suggesting that the constitutive activation of this pathway may impair Drosophila normal development as previously shown in other tissues.<sup>44</sup> Second, constitutive autophagy activation following *dUsp36* inactivation may directly inhibit cell growth.<sup>26</sup> However, silencing either *Imd* or *Atg5* does not rescue the growth defect of *dUsp36* mutant

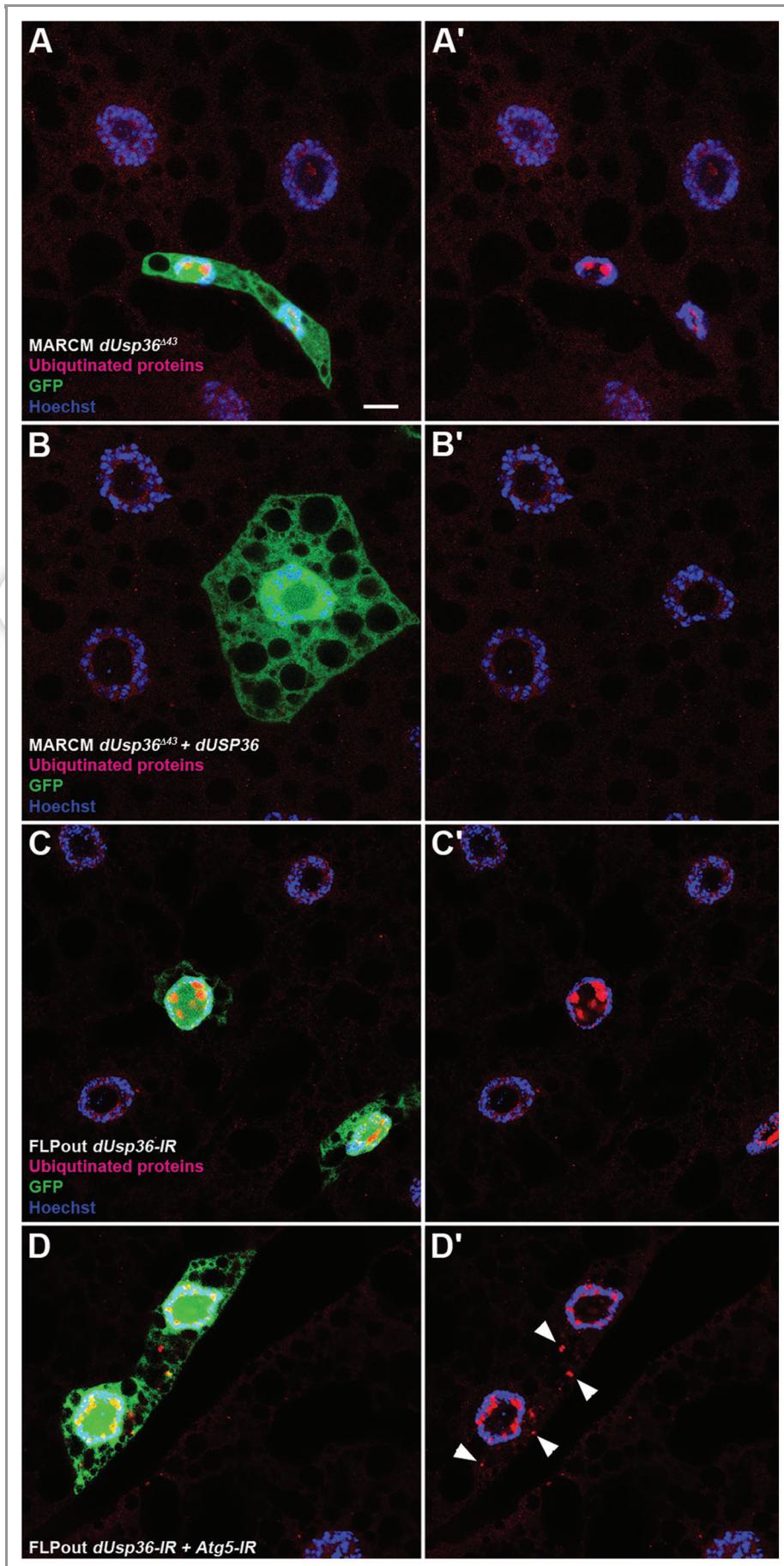
**A****B****C****D****E**

**Figure 4.** Genetic interaction between *dUsp36* and *ref(2)P*. (A) Survival rate of *dUsp36* null mutant larvae or of *ref(2)P*; *dUsp36* double mutant larvae at 4 d AEL (\*\*p < 0.001, independence chi-square test, n = 50 for each genotype). Fluorescent microscope imaging of unfixed fat bodies from *dUsp36* null mutant larvae (B) or *ref(2)P*<sup>Δd2</sup>; *dUsp36* double mutant larvae (C) stained with Lysotracker Red (red) and Hoechst 33342 (blue). Confocal sections of fixed fat body cells stained with Lysotracker Red (red), GFP (green), and DAPI (blue) from *dUsp36* null mutant clone generated either in a wild-type (D) or in a *ref(2)P*<sup>Δd2</sup> mutant background (E). Genotypes: (B) *dUsp36*<sup>Δ43</sup>/*dUsp36*<sup>Δ43</sup> (C) *ref(2)P*<sup>Δd2</sup>/*ref(2)P*<sup>Δd2</sup>; *dUsp36*<sup>Δ43</sup>/*dUsp36*<sup>Δ43</sup> (D) *y,w,hsFLP*+/*FRT79 dUsp36*<sup>Δ43</sup>/*FRT79 UbiGFP* (E) *y,w,hsFLP*+/*ref(2)P*<sup>Δd2</sup>/*ref(2)P*<sup>Δd2</sup>; *FRT79 dUsp36*<sup>Δ43</sup>/*FRT79 UbiGFP*. Scale bar: 10  $\mu$ m.

cells, which rules out these two hypotheses. This led us to consider other mechanisms to explain the cell-growth defects induced by *dUsp36* loss of function. It has been shown that hUSP36 regulates nucleolar structure and function in human cells.<sup>43</sup> If this function is conserved in Drosophila, it could account for the growth defect of *dUsp36* mutant cells as a result

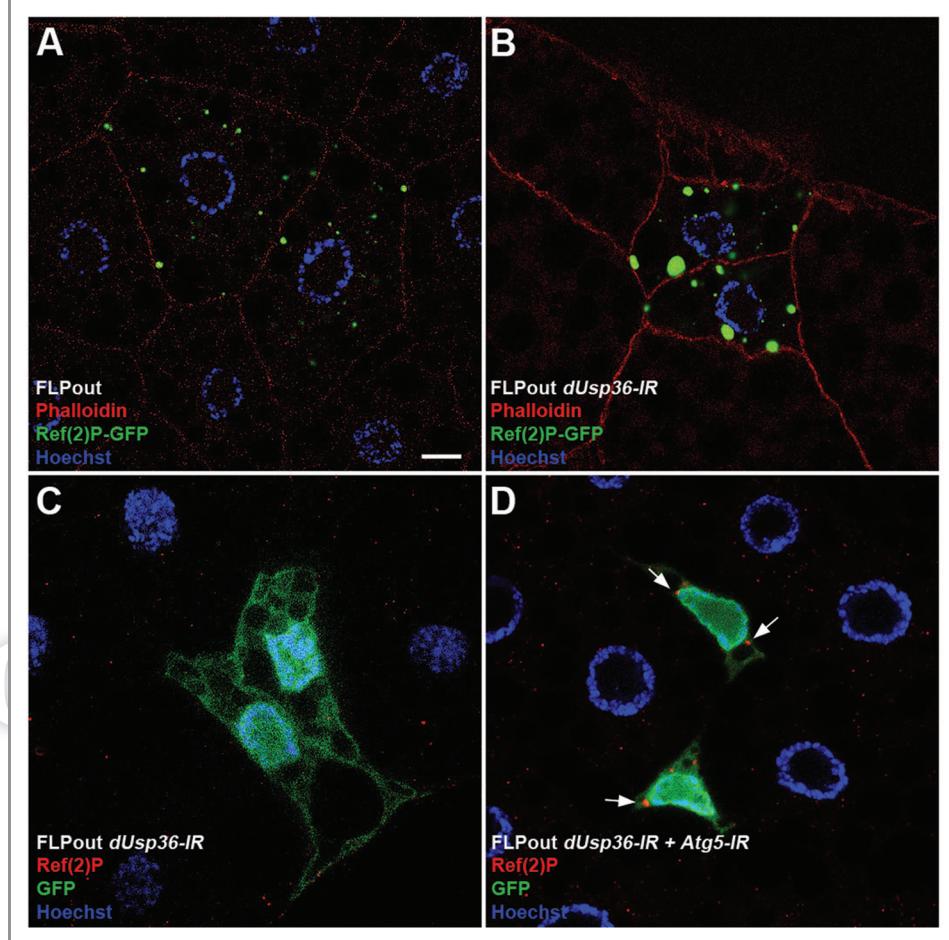
of a general diminution of protein synthesis and metabolism. However, when we examined fibrillarin nucleolar protein expression by immunofluorescence as well as the levels of rRNA transcription by quantitative RT PCR, we did not observe any evidence of nucleolar dysfunction in *dUsp36* mutants (data not shown). In contrast, we observed the accumulation of ubiquitinated proteins and in particular of the ubiquitinated form of the known dUSP36 substrate H2B in the nucleus of the mutant cells. This likely reflects profound defects in the chromatin structure of *dUsp36* mutant cells. These defects may interfere with gene expression and potentially inhibit cell growth. Further investigations are needed to determine whether the aberrant ubiquitination of histone H2B contributes to defective cell growth of *dUsp36* mutant cells.

Next, we characterized the role of the deubiquitinating enzyme USP36 in autophagy. In both Drosophila and human cell lines we observed accumulation of GFP-LC3 positive vesicles when *Usp36* was knocked down. These vesicles were dependent on the presence of ATG1 and ATG5 indicating that they are bona fide autophagosomes. This was confirmed using an anti-LC3B antibody to detect the endogenous LC3 protein: we observed an increase of the lipidated form of LC3 and of the number of autophagosomes following USP36 inactivation in human cell lines. Accumulation of autophagosomes could be due either to de novo autophagosomes formation or to inhibition of autophagosomes maturation. In Drosophila, the increase in autophagosomes number was correlated with an increase of lysosomes. In human cells, normal degradation of the autophagy substrate p62 and partial colocalization of autophagosomes with the lysosomal marker LAMP-1 were observed. Moreover, baflomycin A<sub>1</sub>, an inhibitor of autolysosome acidification, did not block the effects of hUSP36 inactivation on autophagy. These results indicate that the whole autophagy flux is activated in the mutant cells. Thus, USP36 inhibits upstream events of the autophagosome formation complex. In order to depict the molecular involvement of USP36 in the autophagy flux regulation, we tested the ability of USP36 to interact with several autophagy-related proteins involved in this process. Through a yeast-2-hybrid assay, we did not identify interactions between hUSP36 and either ATG3/4/9/10/12, LC3, BECLIN 1, or VPS34 (data not shown). However, we showed that autophagy induced by *Usp36* knockdown required the p62/SQSTM1 adaptor protein in both Drosophila and human cells. This result implies that *Usp36* knockdown induces selective ubiquitin-mediated autophagy. The involvement of p62 suggests that ubiquitinated substrates accumulate following *Usp36* inactivation. These ubiquitinated proteins may then be selectively recognized and aggregated by p62, and ultimately targeted to autophagosomes. This hypothesis is supported since cytoplasmic ubiquitinated proteins and p62 itself accumulated in *dUsp36* mutant cells in which autophagy is inhibited. Therefore, autophagy is required to degrade ubiquitinated proteins accumulating upon *dUsp36* loss of function. Proteasome inhibition is known to promote the accumulation of ubiquitinated proteins and activate autophagy.<sup>45</sup> However, USP36 is unlikely to directly interfere with proteasomal function. Indeed, despite extensive proteomic analysis of the



**Figure 5.** Ubiquitinated proteins accumulate in *dUsp36* mutant cells and are eliminated by autophagy. Confocal sections of fat body cells stained with nuclear GFP (green), the FK2 monoclonal antibody detecting ubiquitinated proteins (red), and DAPI (blue). *dUsp36* null mutant cells generated by MARCM (A, A') and *dUsp36* RNAi silenced cells generated by FLPout (C, C') accumulate nuclear ubiquitinated protein aggregates. These aggregates are not observed in rescued cells (B, B'). Cytoplasmic ubiquitinated protein aggregates are observed upon autophagy inhibition in *Atg5*; *dUsp36* double knockout cells. Genotypes: (A, A') *y,w, hsFLP/+; Cg-Gal4, UAS-GFPnls/+; FRT80 dUsp36<sup>Δ43</sup>/FRT80 TubGal80* (B, B') *y,w,hsFLP/UAS-dUsp36; Cg-Gal4, UAS-GFPnls/+; FRT80 dUsp36<sup>Δ43</sup>/FRT80 TubGal80* (C, C') *y,w, hsFLP/+; UAS-GFPnls,UAS-dUsp36-IR/+; Ac > CD2 > Gal4/+* (D, D') *y,w,hsFLP/UAS-Atg5-IR; UAS-GFPnls,UAS-dUsp36-IR/+; Ac > CD2 > Gal4/+*. Scale bar: 10  $\mu$ m.

oscience.  
route.



**Figure 6.** The Ref(2)P/p62 protein accumulates in *dUsp36* silenced cells. Confocal sections of fat body cells after FLPout induced expression of the Ref(2)P-GFP fusion protein in wild-type (A) or *dUsp36* knock-down cells (B). The size and intensity of Ref(2)P-GFP dots are enhanced by *dUsp36* inactivation. Expression of the endogenous Ref(2)P protein in fat body cells expressing the *dUsp36-IR* transgene alone (C) or in combination with *Atg5-IR* (D) shows that, as ubiquitinated proteins, the endogenous Ref(2)P protein accumulates in *Atg5*; *dUsp36* double knockout cells. Genotypes: (A) *y,w,hsFLP/+; UAS-Ref(2)P-GFP/+*, *Ac > CD2 > Gal4/+* (B) *y,w,hsFLP/+; UAS-Ref(2)P-GFP; UAS-dUsp36-IR/+*, *Ac > CD2 > Gal4/+* (C) *y,w,hsFLP/+; UAS-GFPnls; UAS-dUsp36-IR/+*, *Ac > CD2 > Gal4/+* (D) *y,w,hsFLP/UAS-Atg5-IR; UAS-GFPnls; UAS-dUsp36-IR/+*, *Ac > CD2 > Gal4/+*. Scale bar: 10  $\mu$ m.

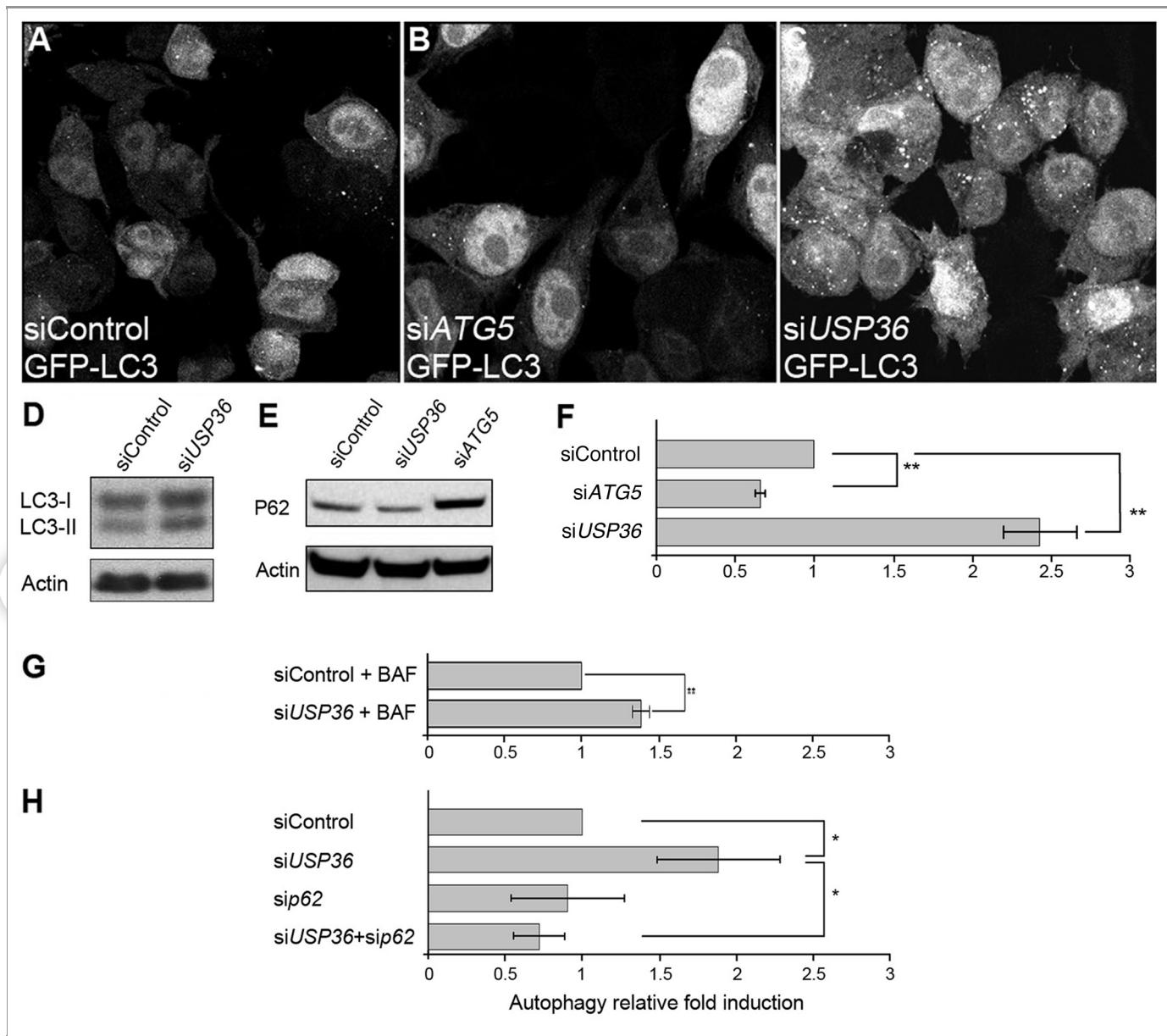
proteasome, USP36 has never been described as a proteasome associated deubiquitinating enzyme. In metazoans, the three proteasomal deubiquitinating enzymes are RPN11 (also known as POH1), USP14 (the *S. cerevisiae* ortholog of which is known as Ubp6), and UCH37 (also known as UCH-L5).<sup>46</sup> Alternatively, we propose that USP36 is required for the deubiquitination of specific, as yet unknown, autophagy substrates thereby regulating their targeting to autophagosomes (Fig. S9). Identification of these substrates will provide a better understanding of the molecular mechanisms involved in the selective elimination of autophagy substrates mediated by p62.

Our study demonstrates that by preventing accumulation of ubiquitinated proteins, USP36 inhibits selective autophagy and thus identifies for the first time a deubiquitinating enzyme controlling activation of selective autophagy. Interestingly, a genome-wide siRNA screen in human cells has recently identified two deubiquitinating enzymes, USP19 and USP24, as negative regulators of autophagy under normal nutritional conditions.<sup>47</sup>

The mechanisms by which these two deubiquitinating enzymes negatively regulate autophagy remain to be elucidated. This suggests that USP36 may not be the only deubiquitinating enzyme acting as an inhibitor of selective autophagy and that the interplay between ubiquitination and deubiquitination participates in selective autophagy regulation.

## Materials and Methods

**Drosophila stocks and clonal analysis.** Flies were reared at 25°C on standard cornmeal-yeast medium. *dUsp36<sup>443</sup>*, a null *dUsp36* allele, and the *UAS-dUsp36* transgene are described in Thevenon et al.<sup>23</sup> The strains required for clonal analysis and the *UAS-InR*, *UAS-Akt1* and *UAS-S6K* transgenic lines are from the Bloomington Stock Center. The strains required for FLPout and the *UAS-Rheb* transgenic line were from Dr. Leopold's laboratory. The RNAi transgenes, except *UAS-Atg5-IR*, were obtained from the Vienna Drosophila RNAi Center. The *UAS-GFP-LC3*



**Figure 7.** The reduced expression of USP36 induces p62-dependent autophagy in human cells. Confocal section of GFP-LC3-HeLa cells transfected with control siRNA (A), or siRNA targeting either ATG5 (B) or USP36 (C). Western blot analysis of LC3 (D) and p62 (E) expressions in total cell lysates. (F-H) Quantification of GFP<sup>+</sup> vesicles per cell profile. Comparison of siControl, siATG5 and siUSP36-transfected cells (F), of siControl and siUSP36-transfected cells treated with baflomycin A<sub>1</sub> (BAF, G) and of siControl, siUSP36, sip62 and siUSP36+sip62-transfected cells (H). Results are expressed as the relative fold induction of dots number in siATG5 or siUSP36, sip62 or siUSP36+sip62-treated cells compared with control cells for 3 individual experiments (\*\*p < 0.01, \*p < 0.05, Student's test).

transgene was provided by Dr. H. Stenmark. The *UAS-Atg5-IR* and *UAS-Ref(2)P-GFP* transgenes and the null *atg1* allele *atg1<sup>43D</sup>* were obtained from Dr. T. Neufeld. The *Ref(2)P<sup>d2</sup>* and *Ref(2)P<sup>d3</sup>* mutant alleles were obtained from Dr. S. Gaumer.

For clonal analysis in the fat body, 0–6 h embryos were subjected to heat-shock for 1 h at 37°C and resulting female L3 larvae were dissected at the indicated time point. For the FLPout GAL4/UAS method, spontaneous activation of the GAL4 transcription factor has been reported<sup>48</sup> and allows for

the induction of GAL4 expressing cells without heat-shock. Female L3 larvae were dissected at the indicated time point.

**Immunocytochemistry and microscopy.** Lysotracker staining was performed on unfixed larval fat bodies as described in Scott et al.<sup>13</sup> Images were obtained with a Zeiss Axiovert 200M microscope.

For immunocytochemistry, lateral lobes of larval fat bodies were dissected in PBS and fixed for 30 min in 4% paraformaldehyde. For quantification of cell size and autophagy levels,

after rinsing in PBS, samples were incubated overnight at 4°C in 2 U/ml Alexa Fluor 546 Phalloidin (Invitrogen, A22283). For antibody staining, samples were blocked for 1 h in PBS, 0.1% Triton X-100, 5% normal goat serum and then incubated overnight at 4°C with the FK2 monoclonal antibody (Millipore, 04–263) diluted 1:10,000, with the anti-ubiquitinated Histone H2B antibody (Millipore, clone 56) diluted 1:500 or with the anti-Ref(2)P antibody<sup>39</sup> diluted 1:500. After mounting in DAPI containing Vectashield (Vector Laboratories, H-1200), the samples were imaged with a 40x or 63x magnification (oil immersion) using a Leica TCS SP2 confocal microscope and the LCS software. Cell size was quantified as the ratio between the areas of a GFP<sup>+</sup> cell and of neighboring GFP<sup>-</sup> cells.

GFP-LC3-HeLa cells were fixed with 4% paraformaldehyde and analyzed using a Zeiss Axiovert 100M microscope equipped with the LSM 510 system and observed with a magnification of 63× (oil immersion). The number of GFP<sup>+</sup> vesicles per cell profile was enumerated from one single plan section per cell. The number of GFP<sup>+</sup> vesicles was counted using 100 to 200 cells for each independent experiment.

Bafilomycin A<sub>1</sub> for flux experiments was purchased from Sigma (Sigma, B1793). GFP-LC3 HeLa cells were treated for 5hrs with 100 nM of bafilomycin.

**Human cells and antibodies.** HeLa and GFP-LC3-HeLa cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 0.5mg/mL gentamicin, 2mM L-glutamine and 10% fetal calf serum. Anti-actin (A2066), anti-LC3B (L7543) and anti-ATG5 (A0856) were purchased from Sigma. Anti-p62 (sc-28359) was purchased from Santa Cruz biotechnology. Anti-rabbit HRP (NA 934) was

## References

1. García-Arenzibia M, Hochfeld WE, Toh PP, Rubinstein DC. Autophagy, a guardian against neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21: 691–8; PMID:2088203; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2010.02.008>
2. Dikic I, Johansen T, Kirkin V. Selective autophagy in cancer development and therapy. *Cancer Res* 2010; 70:3431–4; PMID:20424122; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4027>
3. Shelly S, Lukinova N, Bambina S, Berman A, Cherry S. Autophagy is an essential component of Drosophila immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity* 2009; 30:588–98; PMID:19362021; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.009>
4. Deretic V. Autophagy in infection. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:252–62; PMID:20116986; <http://dx.doi.org/10.1016/j.celb.2009.12.009>
5. Yano T, Mita S, Ohmori H, Oshima Y, Fujimoto Y, Ueda R, et al. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol* 2008; 9:908–16; PMID:18604211; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1634>
6. Kanki T, Klionsky DJ. The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Mol Microbiol* 2010; 75:795–800; PMID:20487284; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07035.x>
7. Joubert PE, Meiffren G, Grégoire IP, Pontini G, Richetta C, Flacher M, et al. Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* 2009; 6:354–66; PMID:19837375; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.006>
8. Inoue Y, Klionsky DJ. Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21:664–70; PMID:20359542; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2010.03.009>
9. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1102–9; PMID:17909521; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1007-1102>
10. Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S, Levine B. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* 2005; 1:46–52; PMID:16874027; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.1.1.1542>
11. Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci* 2006; 119:259–70; PMID:16390869; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02735>
12. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:124–31; PMID:20034776; <http://dx.doi.org/10.1016/j.celb.2009.11.014>
13. Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev Cell* 2004; 7:167–78; PMID:15296714; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.009>
14. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 2009; 34:259–69; PMID:19450525; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.026>
15. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282: 24131–45; PMID:17580304; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M702824200>
16. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005; 171:603–14; PMID:16286508; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200507002>
17. Kirkin V, Lamark T, Johansen T, Dikic I. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* 2009; 5:732–3; PMID:19398892; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.5.5.8566>
18. Cemma M, Kim PK, Brumell JH. The ubiquitin-binding adaptor protein p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target *Salmonella* to the autophagy pathway. *Autophagy* 2011; 7:341–5; PMID:21079414; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.3.14046>
19. Clausen TH, Lamark T, Isakson P, Finley K, Larsen KB, Brech A, et al. p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* 2010; 6:330–44; PMID:20168092; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6.3.11226>

purchased from Amersham Biosciences. Anti-LAMP1 (555798) was purchased from BD Pharmigen.

**Small interfering RNA experiments.** Smartpool si-ATG5, si-p62, si-USP36 and control si-RNA were from Dharmacon. 2.10<sup>5</sup> HeLa or HeLa-GFP-LC3 were plated in 6-well plates 24 h prior to transfection with 100 pmol si-RNA using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, 13778-100) according to manufacturer's instructions.

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

We thank J. Jackson and D. Schneider for critical reading of the manuscript. We are grateful to R. Delanoue, S. Gaumer, P. Leopold, T. Neufeld and H. Stenmark for providing mutant and transgenic flies. We also thank S. Gaumer and D. Contamine for the Ref(2)P antibody, D. Grunwald and O. Azocar for help with confocal microscopy, E. Engel and P.E. Joubert for testing and validating siUSP36, and C. Bama and I. Maréchal for fly food preparation. The Bloomington Drosophila Stock Center and Vienna Drosophila RNAi Center contributed to this work by providing mutant and transgenic fly strains. This work was supported by grant from Cluster 10 Infectiologie, Région Rhône Alpes and ANR-08-JCJC-0064-01.

## Supplemental Materials

Supplemental materials can be found at:  
[www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/19381](http://www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/19381)

20. Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, Anderson M, Jeong H, Melia TJ, et al. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alf. *Mol Cell* 2010; 38:265-79; PMID:20417604; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.007>

21. Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; 12:119-31; PMID: 20098416; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2012>

22. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 2005; 123:773-86; PMID:16325574; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.007>

23. Thevenon D, Engel E, Avet-Rochex A, Gottar M, Bergeret E, Tricoire H, et al. The Drosophila ubiquitin-specific protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signaling. *Cell Host Microbe* 2009; 6:309-20; PMID:19837371; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.007>

24. Ribaya JP, Ranmuthu M, Copeland J, Boyarskiy S, Blair AP, Hay B, et al. The deubiquitinase emperor's thumb is a regulator of apoptosis in Drosophila. *Dev Biol* 2009; 329:25-35; PMID:19217892; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.02.005>

25. Buszczak M, Paterno S, Spradling AC. Drosophila stem cells share a common requirement for the histone H2B ubiquitin protease scrawny. *Science* 2009; 323:248-51; PMID:19039105; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1165678>

26. Scott RC, Juhász G, Neufeld TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* 2007; 17:1-11; PMID: 17208179; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.053>

27. Lee T, Luo L. Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for Drosophila neural development. *Trends Neurosci* 2001; 24:251-4; PMID:11311363; [http://dx.doi.org/10.1016/S0896-2236\(00\)01791-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0896-2236(00)01791-4)

28. Rusten TE, Lindmo K, Juhász G, Sass M, Seglen PO, Brech A, et al. Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell* 2004; 7: 179-92; PMID:15296715; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2004.07.005>

29. Kimura S, Fujita N, Noda T, Yoshimori T. Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods Enzymol* 2009; 452:1-12; PMID:19200872; [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03601-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03601-X)

30. Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP. Regulation of cellular growth by the Drosophila target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* 2000; 14:2712-24; PMID:11069888; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.835000>

31. Gilquin B, Taillebourg E, Cherradi N, Hubstenberger A, Gay O, Merle N, et al. The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. *Mol Cell Biol* 2010; 30:1984-96; PMID:20154147; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00007-10>

32. Juhász G, Hill JH, Yan Y, Sass M, Baehrecke EH, Backer JM, et al. The class III PI(3)K Vps34 promotes autophagy and endocytosis but not TOR signaling in Drosophila. *J Cell Biol* 2008; 181:655-66; PMID: 18474623; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200712051>

33. Hennig KM, Neufeld TP. Inhibition of cellular growth and proliferation by dTOR overexpression in Drosophila. *Genesis* 2002; 34:107-10; PMID:12324961; <http://dx.doi.org/10.1002/gene.10139>

34. Pignoni F, Zipursky SL. Induction of Drosophila eye development by decapentaplegic. *Development* 1997; 124:271-8; PMID:9053304

35. Calgaro S, Boube M, Cribbs DL, Bourbon HM. The Drosophila gene taranis encodes a novel tritrophic group member potentially linked to the cell cycle regulatory apparatus. *Genetics* 2002; 160:547-60; PMID:11861561

36. Avila A, Silverman N, Diaz-Meco MT, Moscat J. The Drosophila atypical protein kinase C-ref(2)P complex constitutes a conserved module for signaling in the toll pathway. *Mol Cell Biol* 2002; 22:8787-95; PMID: 12446795; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.24.8787-8795.2002>

37. Carré-Mlouka A, Gaumer S, Gay P, Petitjean AM, Coulondre C, Dru P, et al. Control of sigma virus multiplication by the ref(2)P gene of Drosophila melanogaster: an in vivo study of the PB1 domain of Ref(2)P. *Genetics* 2007; 176:409-19; PMID:17409092; <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.106.063826>

38. Nezis IP, Simonsen A, Sagona AP, Finley K, Gaumer S, Contamine D, et al. Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J Cell Biol* 2008; 180:1065-71; PMID:18347073; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200711108>

39. Wyers F, Petitjean AM, Dru P, Gay P, Contamine D. Localization of domains within the Drosophila Ref(2)P protein involved in the intracellular control of sigma rhabdovirus multiplication. *J Virol* 1995; 69:4463-70; PMID:7769706

40. Dezelee S, Bras F, Contamine D, Lopez-Ferber M, Segretain D, Teninges D. Molecular analysis of ref(2)P, a Drosophila gene implicated in sigma rhabdovirus multiplication and necessary for male fertility. *EMBO J* 1989; 8:3437-46; PMID:2510997

41. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006; 441:885-9; PMID: 16625204; <http://dx.doi.org/10.1038/nature04724>

42. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006; 441:880-4; PMID:16625205; <http://dx.doi.org/10.1038/nature04723>

43. Endo A, Matsumoto M, Inada T, Yamamoto A, Nakayama KI, Kitamura N, et al. Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. *J Cell Sci* 2009; 122:678-86; PMID: 19208757; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.044461>

44. Maillet F, Bischoff V, Vignal C, Hoffmann J, Royet J. The Drosophila peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation. *Cell Host Microbe* 2008; 3:293-303; PMID:18474356; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2008.04.002>

45. Jänen SB, Chaachouay H, Richter-Landsberg C. Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes. *Glia* 2010; 58:1766-74; PMID:20645412; <http://dx.doi.org/10.1002/glia.21047>

46. Lee MJ, Lee BH, Hanna J, King RW, Finley D. Trimming of ubiquitin chains by proteasome-associated deubiquitinase enzymes. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10:R110.003871; PMID:20823120; <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.R110.003871>

47. Lipinski MM, Hoffman G, Ng A, Zhou W, Py BF, Hsu E, et al. A genome-wide siRNA screen reveals multiple mTORC1 independent signaling pathways regulating autophagy under normal nutritional conditions. *Dev Cell* 2010; 18:1041-52; PMID:20627085; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.005>

48. Hennig KM, Colombani J, Neufeld TP. TOR coordinates bulk and targeted endocytosis in the Drosophila melanogaster fat body to regulate cell growth. *J Cell Biol* 2006; 173:963-74; PMID:16785324; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200511140>



## L'ubiquitination et le trafic endocytaire régulent la réponse immunitaire de la drosophile

Le système immunitaire inné repose sur la détection de motifs microbiens et l'activation de réponses adaptées, parmi lesquelles les voies de signalisation dépendantes des facteurs NF-κB jouent un rôle primordial. Ces voies sont finement régulées afin d'éviter une réponse immunitaire excessive et soutenue dans le temps qui peut causer de nombreuses pathologies, comme les maladies auto-immunes et pro-inflammatoires. Au cours de ma thèse, j'ai élucidé certains mécanismes de régulation des voies de signalisation NF-κB, Toll et IMD, chez la drosophile, qui reposent sur l'ubiquitination de protéines et leur dégradation par la voie endocytaire ou le protéasome.

L'ubiquitination réversible des protéines est une modification post-traductionnelle qui permet de réguler leur activité, leur stabilité et leur localisation subcellulaire. En particulier, l'ubiquitination des récepteurs membranaires peut servir de signal d'endocytose et de dégradation lysosomale. Chez la drosophile, le récepteur PGRP-LC reconnaît spécifiquement le peptidoglycane (PGN) bactérien de type acide diaminopimélique et induit la voie de signalisation IMD. J'ai montré que PGRP-LC est ubiquitiné, internalisé et dégradé par la voie endocytaire. Dans ce processus, j'ai identifié le rôle majeur de la déubiquitinase USP8 qui contrôle la dégradation de PGRP-LC ubiquitiné. J'ai aussi mis en évidence que la stimulation de la voie IMD par les PGN augmente l'internalisation et la dégradation de PGRP-LC, assurant l'élimination des récepteurs après que la voie IMD ait été activée. En outre, j'ai participé à des études visant à comprendre le rôle des déubiquitinases USP2, USP34 et USP36, préalablement sélectionnées par l'équipe comme des régulateurs négatifs des voies IMD et/ou Toll. Mes résultats ont notamment contribué à montrer que USP2 agit principalement au niveau de la protéine adaptatrice Imd, en permettant l'hydrolyse de ses chaînes d'ubiquitine K48 et sa dégradation par le protéasome. Finalement, j'ai observé que USP2 interagit également avec PGRP-LC et favorise l'hydrolyse des chaînes K48 associées à ce récepteur, bien que dans ce cas, la dégradation des formes poly-ubiquitinées K48 de PGRP-LC ne dépende pas du protéasome, mais des protéines de la voie endocytaire Hrs, Rab5 et de la déubiquitinase USP8.

**Mots clés :** IMD, PGRP-LC, endocytose, protéases d'ubiquitine (USP), NF-κB, *Drosophila melanogaster*

## Ubiquitination and endocytic trafficking regulate the immune response in *Drosophila*

The innate immune system relies on the recognition of “non-self” and on the activation of adapted responses, among which NF-κB signaling pathways play a crucial role. These pathways are tightly regulated, in order to prevent an excessive and sustained immune response, responsible for several pathologies, such as autoimmune and pro-inflammatory diseases. During my PhD thesis, I elucidated some *Drosophila* regulatory mechanisms of NF-κB pathways, Toll and IMD, which rely on protein ubiquitination and their subsequent degradation by the endocytic pathway or proteasome.

Reversible ubiquitination of proteins is a post-translational modification, regulating their activity, their stability and the subcellular localization. In particular, ubiquitination of membrane receptors could trigger their internalization and their subsequent lysosomal degradation. In *Drosophila*, the PGRP-LC receptor specifically recognizes diaminopimelic acid containing peptidoglycan (PGN) and induces the IMD signaling pathway. I proved that PGRP-LC receptor is ubiquitinated, internalized and degraded by the endocytic pathway. In this process, I identified the major role of the USP8 deubiquitinating enzyme, which controls the degradation of ubiquitinated PGRP-LC. Besides, I showed that the IMD stimulation by PGN enhances the PGRP-LC internalization and its degradation, ensuring receptors elimination once the IMD pathway has been activated. Moreover, I took part to studies, aiming to understand the role of USP2, USP34 and USP36, previously selected by the team as negative regulators of the IMD and/or Toll pathways. In particular, my results showed that USP2 principally acts at the Imd level, allowing for the hydrolysis of its K48 poly-ubiquitin chains and its proteasomal degradation. Finally, I observed that USP2 also interacts with PGRP-LC and favors the hydrolysis of PGRP-LC associated K48 chains, whereas the degradation of K48 poly-ubiquitinated PGRP-LC is independent from the proteasome, but rather depends on the Hrs and Rab5 endocytic proteins and on the USP8 deubiquitinating enzyme.

**Key words :** IMD, PGRP-LC, endocytosis, Ubiquitin Specific Protease (USP), NF-κB, *Drosophila melanogaster*