



HAL
open science

La reconnaissance de la courbure membranaire par ArfGAP1

Bruno Mesmin

► **To cite this version:**

Bruno Mesmin. La reconnaissance de la courbure membranaire par ArfGAP1. Biochimie [q-bio.BM]. Université Nice Sophia Antipolis, 2007. Français. NNT: . tel-00320072

HAL Id: tel-00320072

<https://theses.hal.science/tel-00320072>

Submitted on 10 Sep 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS - UFR Sciences
Ecole Doctorale de Sciences de la Vie et de la Santé

T H E S E

pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences
de l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Discipline : Biochimie

présentée et soutenue par

Bruno MESMIN

La reconnaissance de la courbure membranaire par ArfGAP1

Thèse dirigée par le Dr. Bruno ANTONNY

soutenue le 17 Décembre 2007

Jury :

Pr. Laurent COUNILLON	<i>Président</i>
Dr. Cathy JACKSON	<i>Rapporteur</i>
Dr. Eve-Isabelle PÉCHEUR	<i>Rapporteur</i>
Dr. Eric HONORÉ	<i>Examineur</i>
Pr. Germain TRUGNAN	<i>Examineur</i>
Dr. Bruno ANTONNY	<i>Directeur de thèse</i>

SOMMAIRE

Avant propos	3
I. Les membranes biologiques	6
1) Les lipides majeurs des membranes	7
2) La structure de la membrane	10
3) La compartimentation et les membranes cellulaires	15
II. Les interactions protéines-membranes	22
1) La reconnaissance spécifique d'un lipide, ou le mécanisme 'clé-serrure'	23
2) Le cas des petites protéines G	26
a) Les modifications lipidiques	27
b) Les autres sites d'ancrages	30
c) Le cycle membrane/cytosol particulier de Rac1	32
3) Etude d'un nouveau domaine de liaison aux membranes	36
III. Le Transport vésiculaire COPI et l'Appareil de Golgi	42
1) La naissance du Golgi	42
2) Un transport vésiculaire dévoilé dans le Golgi	44
a) La découverte d'un manteau	45
b) Arf1 dans le manteau, l'idée d'un cycle	46
3) Aspects structuraux et fonctionnels du transport vésiculaire COP I	50
a) L'activation d'Arf1	51
b) L'assemblage et la fonction du manteau protéique COPI	54
4) L'hydrolyse du GTP d'Arf et le désassemblage du manteau COPI	60
a) Les protéines Arf GAPs	62
b) Réguler la fonction d'ArfGAP1 : Une interaction protéine-protéine ?	64
c) Le DOG : La première venue des lipides pour réguler ArfGAP1	66
d) L'activité d'ArfGAP1 dépend de la courbure membranaire	67
e) Conclusion	69
IV. La reconnaissance de la courbure membranaire	71
1) Préambule	71
2) Méthodes	71
1. Comment faire des liposomes ?	71
2. Comment déterminer la taille des vésicules ou d'autres macromolécules ?	73
3. Comment suivre le changement conformationnel d'Arf1 ?	73
4. Comment suivre l'assemblage et le désassemblage du manteau COPI ?	74
5. Comment mesurer la liaison d'une protéine sur une membrane ?	75
6. Comment déterminer la structure secondaire d'une protéine ?	78
3) Résultats	79
a) Identification d'un motif senseur de courbure membranaire : ALPS	79
Article 1: "ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif"	

<i>b) Un autre motif ALPS dans ArfGAP1 : Implication dans la réponse à la courbure</i>	82
<u>Article 2</u> : "Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature"	
<i>c) La sensibilité singulière des protéines ArfGAP 2 et 3</i>	86
1. Introduction	86
2. Résultats	87
4) Discussion et conclusion	92
<i>a) Domaine BAR et motif ALPS, ou sentir la courbure membranaire différemment</i>	92
<i>b) Aspects physico-chimiques des hélices amphipathiques et du motif ALPS</i>	94
1. Propriétés des hélices amphipathiques et particularités du motif ALPS	94
2. Les hélices amphipathiques préfèrent-elles la courbure membranaire ?	97
3. Physico-chimie structurale des hélices amphipathiques et des motifs ALPS	99
<i>c) La liaison membranaire d'ArfGAP1, adaptation et régulation</i>	102
1. Comparaison ALPS1/ALPS2	102
2. Pourquoi un deuxième ALPS ?	103
3. Le parallèle entre ArfGAP1 et l' α -synucléine	104
4. La phosphorylation, l'idée d'une régulation	106
<i>e) Conclusion</i>	108
Annexes	109
<u>Article A1</u> : "A phosphatidylserine-binding site in the cytosolic fragment of <i>Clostridium sordellii</i> Lethal Toxin Facilitates glucosylation of membrane-bound Rac and is required for cytotoxicity"	
<u>Article A2</u> : "GEF and glucosylation assays on liposome-bound Rac"	
<u>Article A3</u> : "Membrane curvature and the control of GTP hydrolysis in Arf1 during COPI vesicle formation"	
Références Bibliographiques	113

Avant propos

L'eau aime intensément l'eau. C'est ce qui est paradoxalement à l'origine de l'effet hydrophobe, c'est-à-dire ce qui pousse l'huile et l'eau à se séparer. En effet, la force d'attraction d'une chaîne grasse pour une autre est plutôt faible par rapport à celle qui captive les molécules d'eau (Tanford, 1980). Cet effet hydrophobe est à l'origine de nombreux phénomènes, allant du nettoyage de notre linge jusqu'au repliement d'une protéine, ou à l'organisation complexe d'une membrane lipidique. Ainsi, les interactions entre groupes non polaires sont énergétiquement favorables puisqu'ils tendent à minimiser leurs interactions défavorables avec l'eau et donc à augmenter les interactions favorables entre les molécules d'eau.

Parallèlement à cela, il existe des molécules qui aiment côtoyer l'eau du fait de leur polarité respective. Ces molécules hydrophiles ont la capacité de former des liaisons hydrogènes avec l'eau. Certaines de ces molécules portent un groupe chargé qui peut entrer en interaction avec un groupe de charge opposée contenu par une autre molécule. La force d'une telle attraction électrostatique, donnée par la loi de Coulomb, dépend de la distance qui sépare les deux molécules : Plus cette distance diminue, plus la force électrostatique croît.

Ces lois physiques simples gouvernent la dynamique de la majorité des processus cellulaires, en influant sur l'assemblage de macromolécules biologiques. Une membrane lipidique par exemple, est un assemblage compact de lipides amphiphiles, c'est-à-dire disposant d'une partie hydrophobe (les chaînes grasses) et d'une partie hydrophile (tête polaire). Ses caractéristiques physicochimiques lui permettent de séparer deux milieux aqueux hétérogènes, et ainsi de créer un environnement clos, différent de l'environnement extérieur.

Les membranes biologiques représentent un tiers du poids sec d'une cellule, et pratiquement la moitié des protéines d'un organisme eucaryote sont membranaires. Certaines de ces protéines, nous le verrons, utilisent les propriétés physiques évoquées ci-dessus, telles que l'hydrophobicité ou l'attraction électrostatique, pour interagir de manière dynamique avec les membranes.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, je décris la structure et la dynamique des membranes biologiques. Cette description me semble nécessaire pour aborder la complexité de certains types d'interactions entre membranes et protéines, que je rapporte dans un second chapitre. Il est illustré de quelques exemples qui sont à mon sens pertinents, mais également d'exemples qui ont fait l'objet de mon travail de thèse. Ensuite je décris le fonctionnement de

l'appareil de Golgi, et en particulier les mécanismes moléculaires responsables du trafic vésiculaire existant en insistant sur sa régulation par le manteau protéique COPI et les protéines GAP d'Arf. Ceci me permet de poser le problème majeur qui a été l'objet de ma thèse : Comment une protéine peut-elle être capable de sentir la courbure d'une membrane avec une précision presque nanométrique ? La solution, nous le verrons, repose sur un jeu subtil entre effet hydrophobe et interactions polaires, bref encore un problème d'huile et d'eau.

CHAPITRE I :

LES MEMBRANES BIOLOGIQUES

Les membranes biologiques

Les membranes sont parmi les objets biologiques les plus communs, et à l'exception de quelques virus, toute chose vivante dépend d'une manière ou d'une autre des membranes.

Elles déterminent la frontière des cellules en formant l'interface entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur. Elles entourent également les compartiments intracellulaires, tels que Lysosomes, Mitochondries, etc. On qualifie couramment la membrane de barrière semi-perméable, c'est-à-dire que la plupart des macromolécules ne la franchissent pas, mais elle sélectionne toutefois certains éléments qui la traversent au moyen de canaux ou de pompes protéiques.

La membrane biologique est un système auto-organisé qui est formé principalement de lipides et de protéines. Sa structure et son organisation ont toujours fasciné les chercheurs, qui de modèles en concepts, ont tenté de percer son secret.

Les premières recherches effectuées sur la structure des membranes cellulaires remontent aux années 1920, à Leiden en Hollande. A l'époque, Evert Gorter et son assistant Grendel analysent les lipides de globules rouges obtenus par extraction en utilisant de l'acétone ou d'autres solvants. Ils démontrent, en profitant des techniques que Langmuir avait mis au point un peu plus tôt, que les molécules lipidiques peuvent former aussi bien une double couche (ou une bicouche), qu'une monocouche. De plus, ils montrent que la surface occupée par les lipides extraits des cellules est à peu près deux fois plus grande que la surface des cellules elles-mêmes. En se basant sur ces deux observations, Gorter et Grendel concluent que « les chromocytes [globules rouges] sont recouverts d'une substance grasse de deux molécules d'épaisseur » (Gorter and Grendel, 1925). Bien qu'ils n'aient pas proposé un modèle général pour les membranes cellulaires, ils ont toutefois décrit une structure membranaire plausible.

Cette organisation spatiale des lipides découle directement de leur structure amphiphile et illustre parfaitement l'effet hydrophobe. Les groupes polaires des lipides font directement face à l'eau, maximisant les interactions hydrophiles, et parallèlement à cela, les chaînes grasses non polaires sont séquestrées loin du contact avec la phase aqueuse.

S'il existe à peu près un millier de lipides différents dans la cellule, la plupart de ceux-ci possèdent des propriétés amphiphiles, et les membranes biologiques sont majoritairement composées de trois grandes classes de lipides.

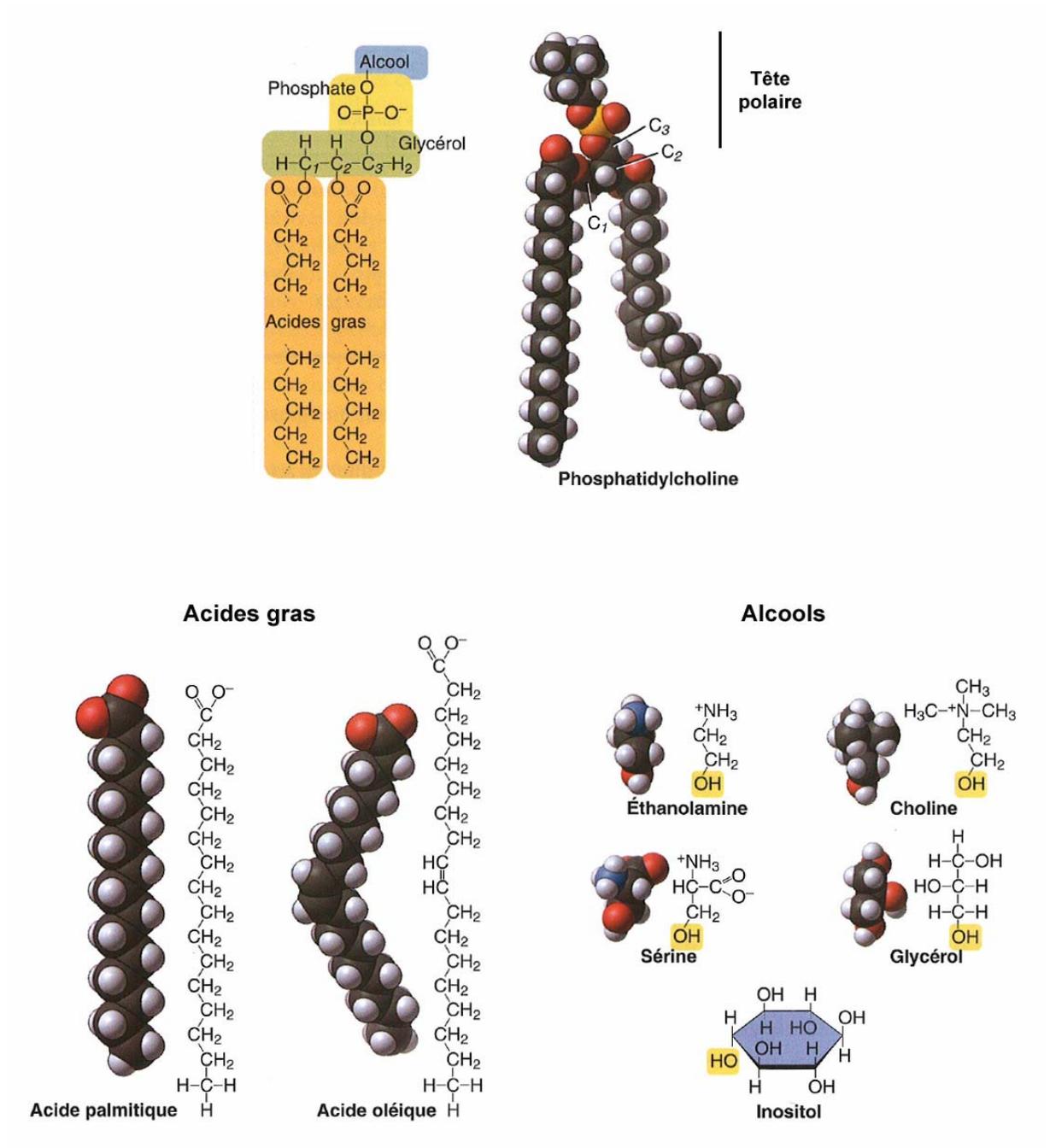


Figure 1 : Composition chimique des phosphoglycérides.

1) Les lipides majeurs des membranes

Les phosphoglycérides sont les principaux constituants des membranes. Ils sont plus communément appelés ‘phospholipides’, mais le terme n’est pas précis sachant qu’il existe d’autres lipides possédant un phosphate mais ne dérivant pas du glycérol. Un phosphoglycéride est donc composé d’un squelette glycérol sur lequel sont greffés, en position 1 et 2 deux longues chaînes d’acides gras estérifiés, et en position 3 un acide phosphorique estérifié : la tête polaire (figure 1). Notons qu’il existe des variétés de lipides ne portant pas de tête polaire (les diacylglycérols ou DAG), ou ne portant pas d’acide gras en position 2 (les lysophosphoglycérides).

En combinant différents acides gras et alcools estérifiés sur le phosphate, les cellules parviennent à faire plus d’une centaine de phosphoglycérides différents. Certains acides gras comportent une ou plusieurs doubles liaisons dans leur chaîne carbonée, et chaque « insaturation » crée un coude dans cette structure (figure 1). Le nom porté par un phosphoglycéride provient de sa tête polaire, et non pas de ses chaînes grasses. Les alcools des têtes polaires habituelles sont la choline, l’éthanolamine, la sérine, le glycérol et l’inositol. Mais un phosphoglycéride peut ne pas contenir d’alcool lié au phosphate, il s’agit dans ce cas de l’acide phosphatidique (PA). Les autres phosphoglycérides sont :

- Phosphatidylcholine (PC)
- Phosphatidyléthanolamine (PE)
- Phosphatidylsérine (PS)
- Phosphatidylglycérol (PG)
- Phosphatidylinositol (PI)

Les têtes polaires de ces espèces disposent de groupes réactifs différents, et de manière importante, ne portent pas la même charge nette. Si toutes les espèces portent une charge négative attribuée par leur phosphate, elle est parfois compensée par une charge positive provenant de l’alcool d’origine : Par exemple, l’atome d’azote de la choline et celui de l’éthanolamine sont chargés positivement. Il en résulte que le PC et le PE sont des phosphoglycérides neutres. En revanche, les espèces PS, PG et PI possèdent toutes une charge nette négative (-1). L’inositol du PI peut être modifié au niveau des groupes hydroxyles de son hexane en position 3, 4 et 5 en y estérifiant des phosphates. Il en résulte les possibilités suivantes : PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃. Ces phosphoinositides sont très négativement chargés, allant de -3 à -7 en charge nette globale.

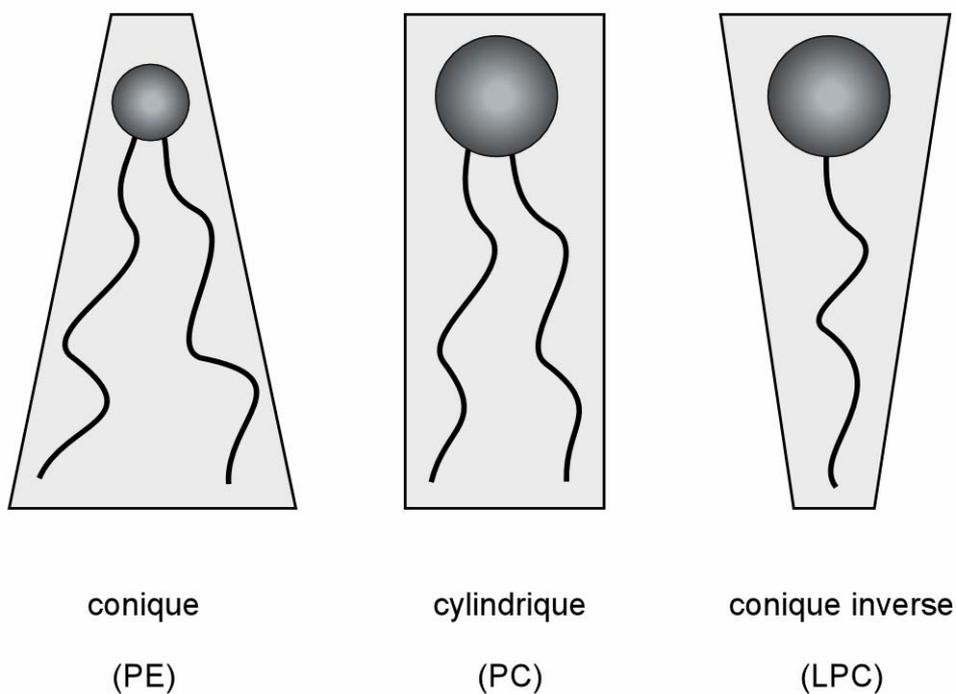


Figure 2 : Formes géométriques des lipides. La forme d'un lipide dépend de la taille relative de sa tête polaire et de la section de la zone occupée par ses chaînes grasses. Par exemple, lorsque ces tailles sont identiques, le lipide a une forme cylindrique.

Acides Gras	Carbones	Double liaison (position)
Myristate	14	0
Palmitate	16	0
Palmitoléate	16	1 ($\Delta 9$)
Stéarate	18	0
Oléate	18	1 ($\Delta 9$)
Linoléate	18	2 ($\Delta 9, \Delta 12$)
Linoléate	18	3 ($\Delta 9, \Delta 12, \Delta 15$)
Arachidonate	20	4 ($\Delta 5, \Delta 8, \Delta 11, \Delta 13$)

Tableau 1 : Chaînes grasses fréquemment retrouvées dans les lipides membranaires.

Tous ces lipides entrent dans des voies métaboliques que je ne détaillerai pas ici. Notons simplement qu'il existe des enzymes localisées principalement à la surface du Réticulum Endoplasmique, permettant l'interconversion de chacune de ces espèces. Par exemple, le PE peut être converti facilement en PC, par trois méthylations successives. Les têtes polaires entières peuvent être échangées, tout comme les chaînes d'acide gras. Certaines enzymes phosphorylent ou déphosphorylent les lipides dérivés du PI, jouant ainsi sur leurs charges mais aussi sur le volume de leurs têtes polaires. D'autres enzymes clivent sélectivement la tête polaire ou une chaîne grasse de ces lipides, et modifient de ce fait leur 'géométrie'.

En effet, la forme géométrique d'un lipide découle de sa structure chimique. Deux paramètres doivent être pris en considération : La taille de la tête polaire du lipide et la section de la zone occupée par ses chaînes carbonées (figure 2) (Sprong et al., 2001) :

- La taille des têtes polaires varie fortement d'un lipide à l'autre (volumes en \AA^3 : PI: 105,5 ; PC: 72,8 ; PS: 61,6 ; PE: 40,8 ; PA: 9,8) (DiNitto et al., 2003). Par exemple, le volume de la tête polaire du PA est dix fois plus petit que celui du PI. De plus, un PI 'décoré' de phosphates supplémentaires dispose d'un volume considérablement plus grand. Ainsi, plusieurs ordres de grandeur séparent le volume de la tête polaire d'un DAG (un simple -OH), de celui d'un PI_(3,4,5)P₃.
- Le deuxième paramètre est relatif au taux d'insaturation des chaînes carbonées d'un lipide. Les acides gras communs retrouvés dans les phosphoglycérides ont une longueur allant de 14 à 20 carbones et portent de 0 à 4 insaturations (tableau 1), les plus fréquents étant le palmitate et l'oléate. Le premier en C16 ne porte pas d'insaturation (C16:0), alors que le second en C18 en porte une en milieu de chaîne (C18:1 Δ 9). L'insaturation provoque un coude dans la chaîne grasse, ce qui l'écarte de l'axe du lipide et de ce fait lui attribue une plus grande envergure locale (figure 1). Notons qu'un second coude peut corriger la déviation de la chaîne grasse apportée par le premier coude, et ainsi de suite.

En résumé, un lipide disposant d'une petite tête polaire et de chaînes grasses volumineuses (de type oléate), possède une forme conique. Par exemple, une molécule de PE possédant un palmitate et un oléate (palmitoyl-oleoyl-PE ou POPE), a tendance à être conique car sa tête polaire est plutôt petite par rapport à l'évasement de sa partie hydrophobe créé par

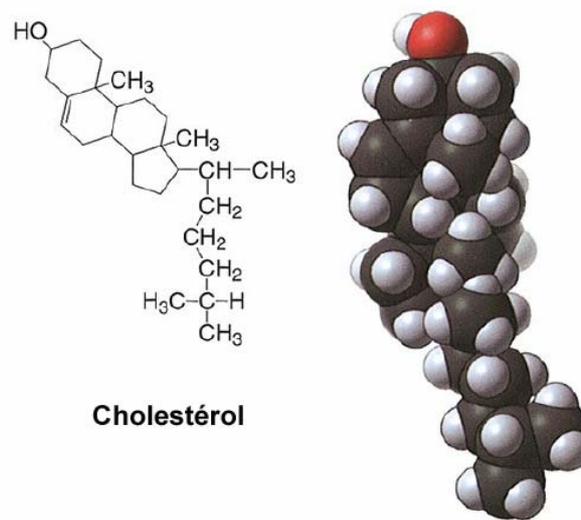
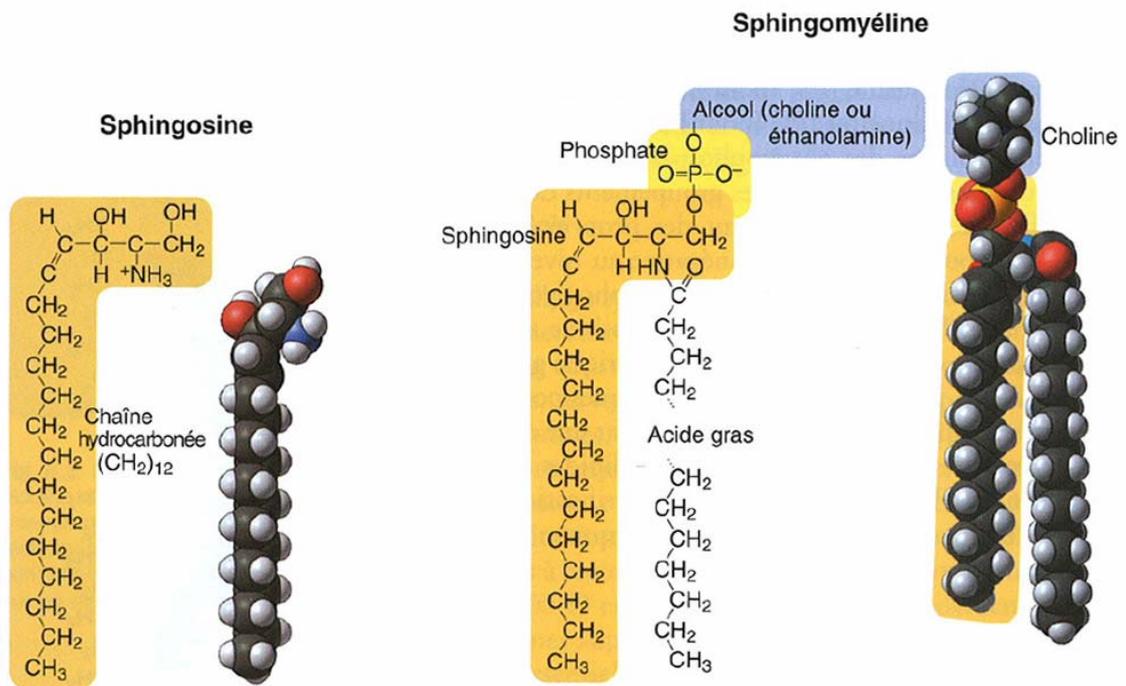


Figure 3 : Composition chimique de la sphingomyéline et du cholestérol.

l'oléate. Une molécule de POPC en revanche a une allure cylindrique, car cet évasement est compensé par une tête polaire de PC beaucoup plus grosse. Dans ce cas, la section de la tête polaire a la même dimension que l'envergure des chaînes grasses. D'autre part, une molécule de DOPC (di-oleoyl-PC) dont les deux chaînes grasses sont coudées, et donc très écartées l'une par rapport à l'autre, possède une forme plus conique. Le cas des lysophosphoglycérides est particulier car ces lipides ne portent qu'une chaîne grasse. De ce fait, ils ont une tête polaire proportionnellement 'grande' par rapport à leur moitié hydrophobe, et adoptent une forme de cône inversé.

Ce polymorphisme des phosphoglycérides joue un rôle particulièrement important dans les propriétés physiques des membranes, nous en reparlerons.

Une seconde classe de phospholipides existe, en moindre quantité, et restreinte à certaines membranes biologiques seulement, il s'agit de la sphingomyéline (SM). Ce lipide est présent de manière importante dans la membrane plasmique, à hauteur de 16 mol%. La SM dérive de la sphingosine, un alcool plus complexe que le glycérol, comprenant un azote et une chaîne insaturée en C14. Les carbones de la sphingosine en position 1 à 3 possèdent des groupes polaires, de plus une double liaison entre les carbones 4 et 5 indique le début de la chaîne grasse (figure 3). Dans la SM, la fonction amine en position 2 est liée à un acide gras par une liaison amide, et la fonction hydroxyle en position 1 est estérifiée à une tête polaire : il s'agit soit d'une phosphocholine, soit d'une phosphoéthanolamine. Ainsi, les têtes polaires des SM sont identiques à celles du PC ou du PE. Notons qu'un sphingolipide dépourvu de tête polaire est appelé céramide, et qu'il existe d'autres sphingolipides possédant un sucre en guise de tête polaire, ce sont les glycosphingolipides.

L'acide gras le plus fréquemment retrouvé dans la SM est le stéarate (C18:0). Le taux d'insaturation très pauvre des chaînes carbonées des sphingolipides semble être une propriété physico-chimique majeure qui les diffère des phosphoglycérides.

La troisième classe majoritaire de lipides membranaires est divergente des deux précédentes par sa nature physico-chimique : Il s'agit des stérols. Le cholestérol est le stérol le plus abondant chez les animaux, mais substitué par d'autres types de stérols chez les plantes (stigmastérol et sitostérol) et les eucaryotes inférieurs (ergostérol chez la levure). Le cholestérol est une molécule particulièrement hydrophobe : Elle est pourvue d'une courte chaîne carbonée liée à un noyau stéroïde volumineux et rigide, sur lequel est attachée une minuscule tête polaire : une simple fonction hydroxyle (figure 3).

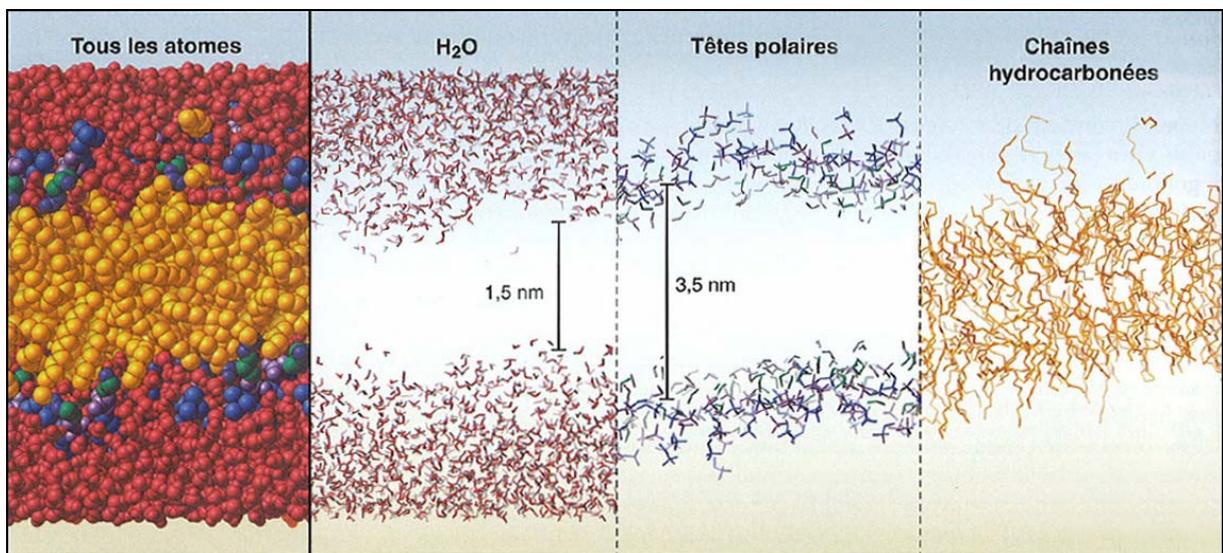


Figure 4 : Modélisation moléculaire d'une bicouche hydratée de phosphatidylcholine. (D'après Chiu et al., 1995).

Ces trois classes de lipides se comportent différemment au sein d'une membrane, et déterminent son aspect physique. Regardons maintenant la structure de la membrane et comment s'y intègrent ces lipides.

2) La structure de la membrane

La membrane est une structure d'une épaisseur de 5 nm de moyenne, formée par deux couches superposées de lipides, dont l'assemblage est dicté principalement par des interactions hydrophobes (figure 4). Ensuite, d'autres forces donnent plus de cohésion à cette structure : Des forces attractives de Van der Waals favorisent l'association des chaînes grasses, et des interactions électrostatiques et hydrogènes existent entre les têtes polaires et les molécules d'eau. L'ensemble de ces interactions se renforcent mutuellement et tendent à ce que la bicouche ne s'interrompe pas, c'est-à-dire, à ce qu'elle se referme sur elle-même. Le résultat étant la formation d'un compartiment, comme par exemple une cellule ou un organelle intracellulaire.

De plus, les membranes ont la capacité de se restaurer d'elles-mêmes en cas de cassure, de manière à ce que les chaînes carbonées des lipides ne soient jamais exposées au milieu aqueux, ce qui est énergétiquement défavorable. Nous profitons de ces propriétés au laboratoire, pour concevoir des vésicules (ou liposomes) de composition lipidique et de taille déterminées : A partir d'un mélange désiré de lipides, solubilisés dans du chloroforme, nous obtenons un film lipidique sec par évaporation. La resuspension de ce film dans un tampon aqueux donne de larges vésicules multilamellaires. Ces vésicules subissent des cycles de congélation/décongélation pour les rendre moins multilamellaires, et sont ensuite extrudées manuellement au travers d'un filtre de polycarbonate contenant des pores calibrés. Cette étape oblige les vésicules à adopter un diamètre homogène, correspondant approximativement à la taille du pore. Nous obtenons ainsi des petits liposomes possédant un compartiment aqueux interne, et ayant un diamètre de 400 à 50 nm selon les filtres utilisés. Ces méthodes utilisées pour faire les liposomes seront détaillées par la suite.

La membrane lipidique n'est pas une structure rigide en soi. En effet, les lipides peuvent diffuser très rapidement de manière latérale, avec un coefficient de diffusion atteignant $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Les lipides peuvent aussi diffuser transversalement, en effectuant un 'flip-flop'

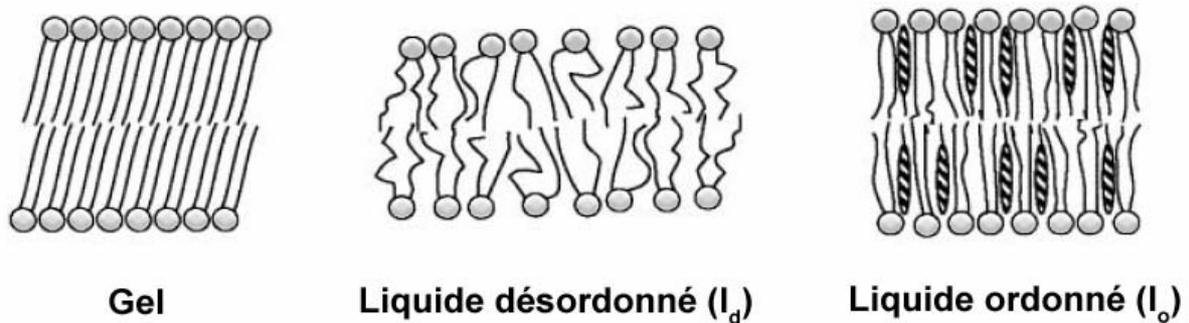


Figure 5 : Structure des bicouches lipidiques. Sous leur température de fusion (T_m), les lipides sont dans une phase solide ou 'gel' qui se fluidifie lorsque la température augmente et devient supérieure à T_m . La phase est alors dite 'liquide désordonnée' ou cristalline liquide. Le cholestérol (représenté en ovale hachuré) tend à ordonner les chaînes grasses des lipides de la phase l_d . Il peut également fluidifier la phase gel. Dans les deux cas, une phase intermédiaire est obtenue : la phase l_o . (Adapté de Munro, 2003).

spontané. Ceci, en revanche, ne concerne que certains lipides, ayant des propriétés physico-chimiques opportunes : Par exemple, le DAG ou le cholestérol peuvent traverser la membrane en moins d'une seconde du fait de leurs têtes polaires minuscules. Par contre, le $t_{1/2}$ de diffusion transversale d'un lipide à grosse tête polaire se compte en heures voire en jours, selon sa taille et sa charge (Sprong et al., 2001). Toutefois, notons l'importance du pH des deux phases aqueuses entourant la membrane dans ce processus de flip-flop : Le groupe de Cullis a montré qu'un lipide anionique peut passer d'un feuillet à l'autre simplement en suivant un gradient de protons transmembranaire (Hope et al., 1989). De plus, il existe dans la cellule de nombreux translocateurs protéiques de lipides appelés 'flippases', qui accélèrent le passage des lipides au travers de la membrane. Ces flippases jouent certainement un rôle dans la répartition des lipides sur les deux feuillets membranaires lors de leur synthèse. Et parallèlement, elles seraient à l'origine de l'asymétrie lipidique constatée dans les différentes membranes de la cellule (Kol et al., 2004; Pomorski et al., 2004).

La composition en acides gras des lipides de la membrane, ainsi que son taux de cholestérol, influent sur ses propriétés physiques. En effet, l'agencement des lipides les uns par rapport aux autres dans une membrane dépend fortement de la conformation spatiale de leurs chaînes grasses, et donc de leur niveau d'insaturation. Des chaînes grasses saturées dans une membrane s'empilent de manière compacte et ordonnée, donnant l'apparence d'une structure rigide. Alors que des chaînes grasses insaturées s'organisent de façon très mal ordonnée et attribuent plus de fluidité à la membrane. Ainsi, les propriétés chimiques des acides gras des lipides conduisent la membrane à être dans une phase 'gel' (solide) ou dans une phase l_d (pour liquide désordonnée) (figure 5). D'autre part, une membrane dans une phase gel peut brutalement basculer dans une phase l_d , si la température passe au-delà de la température de fusion (T_m). L'augmentation de la température induit un changement conformationnel de certaines liaisons C-C, passant d'une conformation *trans* (rigide), à une conformation 'gauche' (fluide). Cette température de transition dépend de la longueur des acides gras et du degré d'insaturation d'une membrane. Il existe d'autre part une phase 'liquide ordonnée' (l_o), qui est un intermédiaire entre la phase gel et la phase l_d . Cette phase est obtenue si des lipides plus rigides mettent de l'ordre dans une phase l_d . Notons que les lipides peuvent diffuser latéralement pratiquement aussi vite dans la phase l_o que dans la phase l_d .

Le cholestérol est l'un des plus importants régulateurs de l'organisation lipidique. Comme les autres lipides, le cholestérol se positionne dans la membrane en fonction de sa

partie hydrophobe et de sa partie hydrophile. Sa tête polaire est située au même niveau que les esters des phospholipides adjacents, et son corps hydrophobe est plaqué contre leurs chaînes carbonées. De façon intéressante, la chimie du cholestérol lui confère des propriétés spéciales: Premièrement, sa structure lui permet de s'insérer dans les espaces membranaires interstitiels. Ensuite, du fait de sa toute petite tête polaire, il interagit de manière privilégiée avec certains lipides, qui ont en l'occurrence de grandes têtes polaires, pour le protéger de l'eau. C'est 'l'effet parapluie' (Maxfield and Tabas, 2005). D'autre part, le noyau cyclique rigide du cholestérol tend à ordonner les chaînes grasses voisines, au niveau de leur région C1-C10. Le cholestérol est de ce fait un bon constituant de la phase l_o , permettant une forte compaction lipidique en s'intercalant entre les chaînes carbonées ordonnées.

Si la phase gel, obtenue généralement lorsque la bicouche est constituée d'une espèce pure de phospholipide saturé, n'est pas physiologique, le problème de la phase l_o est abordé pour les membranes post-golgiennes et surtout pour la membrane plasmique, qui se caractérisent par une forte accumulation en cholestérol. De façon intéressante, dans une membrane modèle, l'augmentation de la concentration en cholestérol ne modifie pas graduellement ses propriétés physiques. En revanche, il existe un seuil de cholestérol au delà duquel une phase riche en cholestérol (l_o) coexiste avec une phase pauvre en cholestérol (l_d). Notons que la phase l_o est également favorisée par les sphingolipides qui sont très saturés, et ont la capacité de former des liaisons hydrogènes entre eux. L'existence d'une telle situation sur la membrane plasmique a fait l'objet de nombreux débats. Le modèle initial des radeaux lipidiques ou *rafts* voulait que le cholestérol et les sphingolipides soient agglomérés dans des domaines l_o , 'flottants' dans une bicouche l_d . Si ce concept de radeau a eu et a encore un grand succès, des questions n'ont jamais été résolues, telles que leur abondance, leur taille, leur nombre, leur composition et finalement leur réelle existence (Munro, 2003). Le modèle des *rafts* dans la membrane plasmique a été récemment révisé, compte tenu des approches biochimiques souvent répréhensibles utilisées jusqu'à aujourd'hui pour les étudier, et il semble manifestement que de grands domaines *rafts* purement lipidiques ne préexistent pas de manière stable sur cette membrane (Hancock, 2006).

La chimie des phospholipides (taille de leur tête polaire, longueur de leurs chaînes grasses, niveau d'insaturation) influence fortement les propriétés physiques de la membrane. En effet, la structure de la membrane représente directement l'espace que cherchent à occuper les lipides qui la composent, et dépend donc de leurs formes géométriques. Par exemple, une

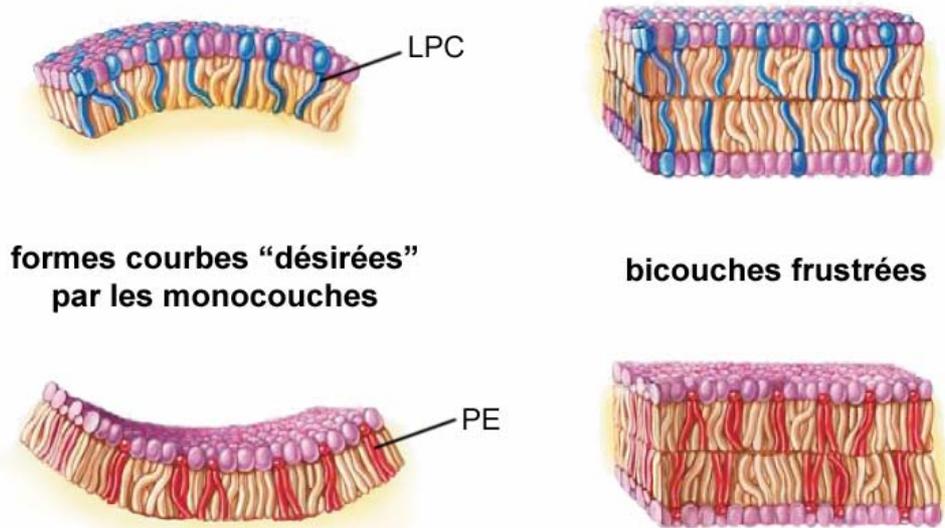


Figure 6 : Une bicouche membranaire riche en LPC ou en PE est frustrée car chacune des monocouches cherche à être courbée du fait des tensions latérales que génèrent ces lipides par leurs formes géométriques. (Adapté de Zimmerberg, 2006).

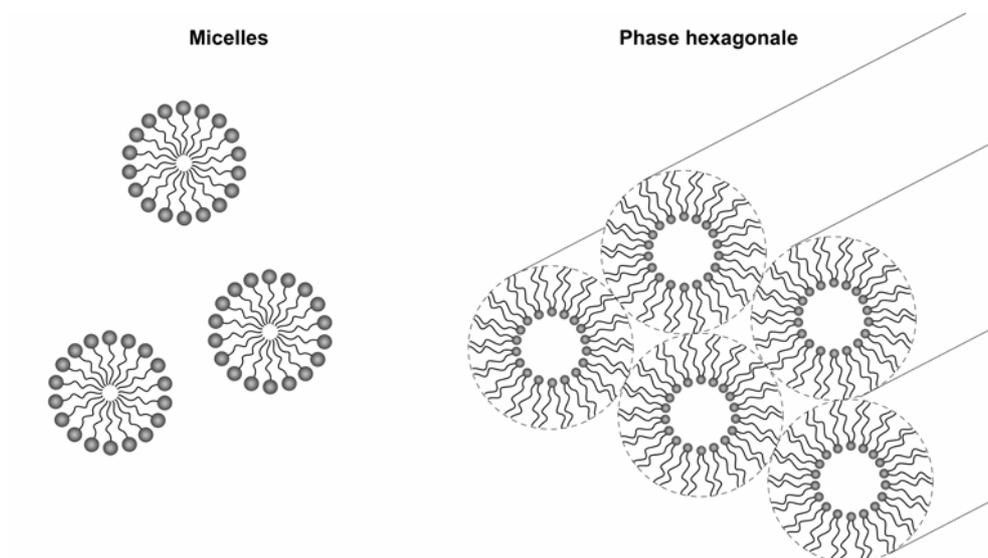


Figure 7 : Illustration de structures lipidiques obtenues avec des lipides purs dont la forme géométrique diffère. Les lipides qui ont une forme en cône inverse, comme le LPC ou encore les détergents, s'organisent en structures de courbure positive : Les micelles. Lorsque la molécule possède une forme conique, une structure de courbure négative est préférée, comme la phase hexagonale.

monocouche lipidique riche en PE adopterait une courbure négative du fait que ces lipides sont coniques. En revanche, une monocouche riche en acide lysophosphatidique (LPA) prendrait plutôt une courbure positive car ce sont des cônes inversés (van Meer and Sprong, 2004). On imagine donc qu'une bicouche, constituée de deux feuillets riches en lipides coniques tels que le PE, doit éprouver une certaine frustration du fait de sa forme lamellaire, allant à l'encontre de la forme courbe 'désirée' par chacune des monocouches (figure 6) (Zimmerberg, 2006). Cette frustration se traduit par des tensions et/ou pressions latérales entre les lipides, cherchant à optimiser les forces de cohésion qui les rassemblent sous cette contrainte énergétique.

Les lipides coniques et coniques inversés sont également connus pour former des structures lipidiques agrégées non lamellaires lorsqu'ils sont purs (van den Brink-van der Laan et al., 2004). Ces structures, peu coûteuses en énergie, se forment lorsque ces lipides sont introduits dans un environnement aqueux. Les cônes inversés, comme le LPA mais aussi comme les détergents, forment des micelles dans l'eau (figure 7). En revanche, les lipides coniques comme le PE, s'associent en une structure de micelles inversées appelée phase hexagonale. Ces structures sont extrêmement rares dans la nature, alors que ces lipides sont abondants dans les membranes biologiques.

Des tensions latérales sont également créées lorsque la bicouche membranaire est courbée. En effet, la courbure entraîne des défauts de compaction des lipides : Le feuillet externe montre alors une courbure positive, ce qui tend à écarter les têtes polaires des lipides les unes des autres, et le feuillet interne une courbure négative, qui au contraire les rapproche. Ce phénomène a beaucoup d'ampleur dans la cellule, dans le sens où de nombreux mécanismes utilisent la capacité de la membrane à pouvoir se courber. Par exemple, le bourgeonnement vésiculaire qui intervient à la surface de membranes planes, la fine tubulation de certaines organelles intracellulaires comme le RE, ou encore la formation d'un pore nucléaire.

L'énergie nécessaire pour courber les membranes est essentiellement fournie par des machineries protéiques, nous en reparlerons longuement. Toutefois, certains auteurs proposent qu'une contribution lipidique est nécessaire dans ce processus. Par exemple, la déformation membranaire intense à la base d'un bourgeon vésiculaire (au niveau du cou de la vésicule) serait régulée par l'enrichissement du feuillet cytoplasmique en lipides coniques comme le PE (figure 8). Alternativement, le feuillet luménal qui accuse une courbure positive

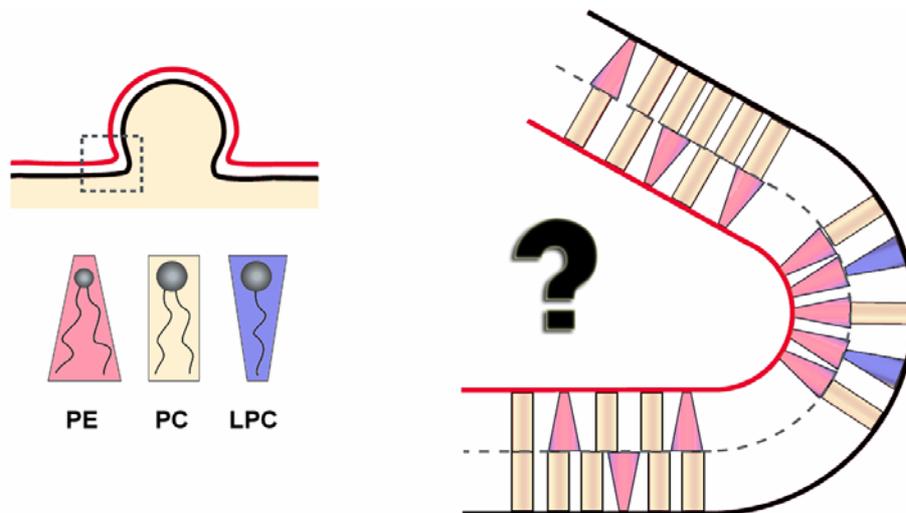


Figure 8 : Une organisation précise de certains lipides dans la membrane pourrait favoriser les déformations membranaires intenses, comme le bourgeonnement vésiculaire. La membrane au niveau du cou d'un bourgeon montre une courbure positive (trait noir) et une courbure négative (trait rouge) ; des lipides adaptés à ces types de courbures pourraient être enrichis à cet endroit. (Adapté de Sprong et al., 2001).

à ce niveau, serait enrichi en lipides coniques inverses comme le LPC. Mais la courbure d'un cou est complexe, car sa section montre que ces courbures peuvent être tout aussi inversées. D'autre part, le feuillet externe d'un bourgeon de 60 nm de diamètre devrait contenir 1,5 fois plus de lipides que sur son feuillet interne, pour éviter tout stress lipidique. Les flippases et d'autres enzymes seraient responsables de ces enrichissements et mouvements lipidiques, et donc en quelque sorte les garants du 'contentement' des lipides lors des déformations membranaires (Kooijman et al., 2003; Sprong et al., 2001). Ce point reste à discuter.

Si les lipides ont des formes géométriques qui en s'additionnant, influencent l'aspect physique d'une membrane, ils sont d'une manière générale plutôt flexibles. Les lipides s'interconvertissent rapidement en de nombreuses configurations isomériques. Par exemple, ceci rend possible la création de liposomes de très petites tailles contenant exclusivement des lipides DOPC, donc coniques. Toutefois, de manière intéressante, l'extrusion manuelle réalisée pour la fabrication de ce type de liposomes demande beaucoup plus de force, que pour un mélange lipidique membranaire classique. Donc, la déformation de membranes riches en lipides coniques est coûteuse en énergie.

Des travaux récents de l'équipe de De Kroon sur la régulation lipidique chez la levure vont dans ce sens. En bloquant les voies métaboliques du PC, par des mutations et par une privation en choline dans le milieu, les auteurs montrent que les levures parviennent à se multiplier sur encore 5 générations, malgré la réduction progressive du taux cellulaire de ce lipide habituellement si abondant. Les résultats obtenus sont stupéfiants : Une augmentation en PE et en PI vient compenser la chute graduelle du PC. De plus, le PC résiduel ainsi que le PE (qui lui devient abondant), subissent un remodelage extensif de leurs chaînes carbonées : D'abord, le ratio des chaînes en C16 par rapport à celles en C18 augmente de 40%, ensuite le degré de saturation des chaînes carbonées augmente de 10% (Boumann et al., 2006). Tout ce passe comme si un équilibre vital entre lipides cylindriques et lipides coniques devait être respecté. En effet, ces changements dans les chaînes grasses pourraient servir à ajuster la courbure membranaire intrinsèque, mais également son épaisseur et sa fluidité. De façon intéressante, le raccourcissement et l'augmentation de la saturation des chaînes grasses du PE, préviendraient son penchant à faire des structures hexagonales décrites plus tôt. Cette étude montre les facultés d'adaptation de la levure pour maintenir une fonction membranaire optimale suivant les aléas de l'environnement.

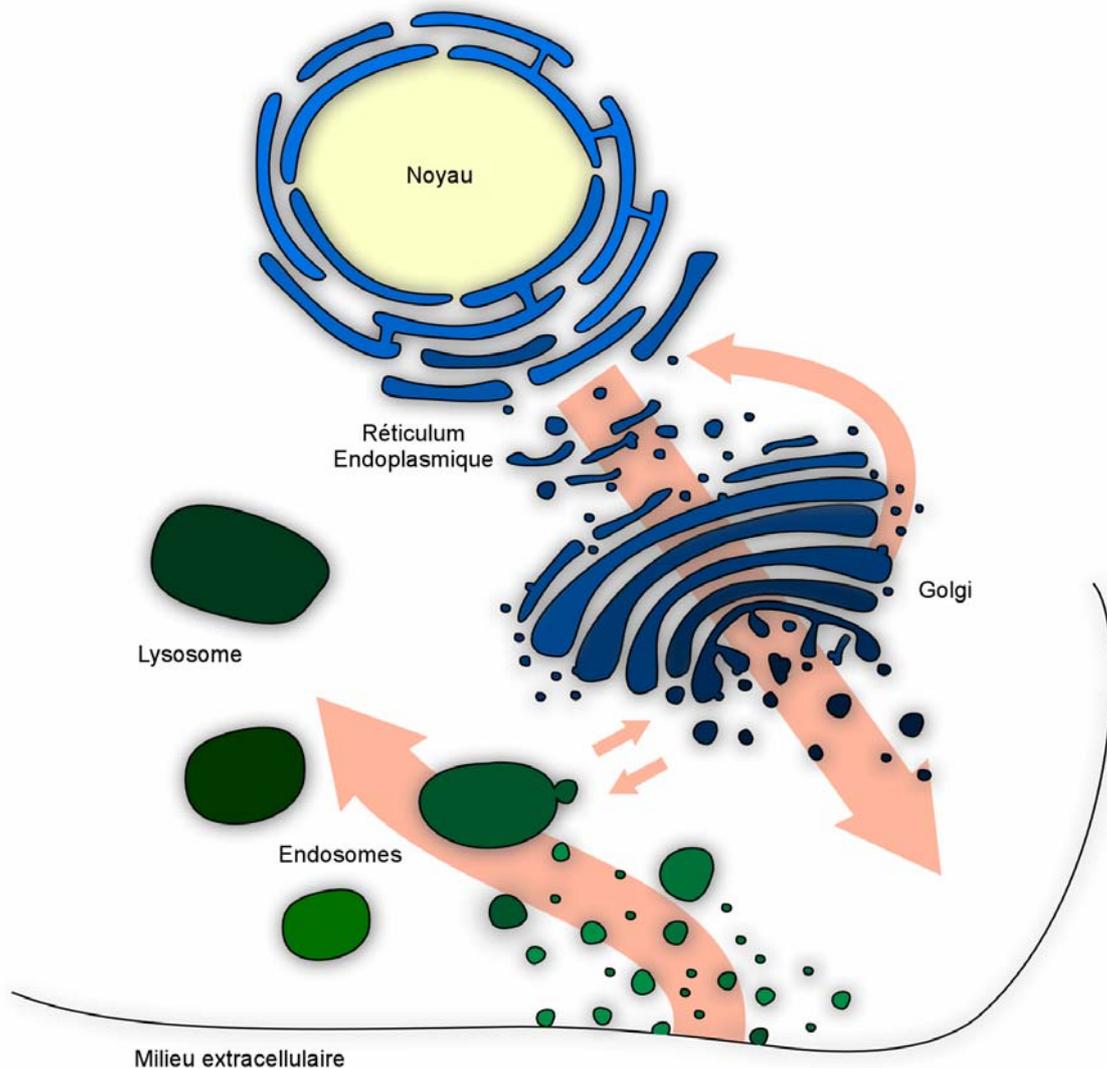


Figure 9 : Les voies de transport antérograde et rétrograde dans la cellule. La voie antérograde (ou sécrétoire) permet l'acheminement de protéines et de lipides depuis leur lieu de synthèse et de maturation (le Réticulum Endoplasmique et le Golgi) vers les organelles de la cellule où vers le milieu extracellulaire dans le cas de protéines sécrétées. La voie rétrograde débute au niveau de la membrane plasmique par l'endocytose. De nombreuses petites vésicules, issues du bourgeonnement de la membrane plasmique, fusionnent avec les endosomes. La maturation de ceux-ci permet soit le recyclage membranaire, soit la formation d'organelles comme le lysosome. Les deux grandes voies de transport communiquent entre elles par l'intermédiaire des endosomes et du Golgi. Le trafic vésiculaire rétrograde propre au Golgi, et entre le Golgi et le Réticulum Endoplasmique permet le recyclage de certaines protéines nécessaires 'en amont', qui ont été entraînées par la maturation des citernes golgiennes.

Les membranes biologiques sont composées d'un mélange de phosphoglycérides, de sphingolipides et de cholestérol, dont les proportions varient considérablement d'une membrane à une autre dans la cellule. Maintenant, regardons plus précisément la distribution cellulaire de ces lipides.

3) La compartimentation et les membranes cellulaires

Les lipides d'une membrane ont une forte tendance à former une structure fermée sur elle-même, dans laquelle chaque acide gras serait à l'abri de l'eau. Ainsi, le compartiment résultant sépare un milieu clôturé d'une barrière lipidique, du milieu extérieur. La cellule, qui est un compartiment en soi, possède de nombreux sous compartiments qui occupent en moyenne la moitié de son volume. Chacun de ces compartiments intracellulaires établit un micro-environnement où des enzymes, des substrats et cofacteurs sont concentrés, augmentant ainsi leurs chances d'interagir du fait de leur diffusion limitée. De plus, les environnements chimiques de part et d'autre de la membrane 'semi-perméable' d'un compartiment peuvent être différents. En effet, la membrane, au moyen de pompes, de canaux et de transporteurs protéiques, contrôle l'entrée et la sortie de solutés qui vont apporter des propriétés physico-chimiques spécifiques à la solution aqueuse du compartiment (pH, concentration ionique, potentiel redox). La membrane des compartiments génère ainsi une asymétrie chimique, nécessaire dans de nombreux phénomènes cellulaires.

Les compartiments intracellulaires, ou organelles, sont abondants et spécialisés. Pour n'en citer que quelques-uns, prenons par exemple le Noyau, le Réticulum Endoplasmique (RE), l'Appareil de Golgi, les Endosomes, les Lysosomes, les Mitochondries et les Peroxysomes. Leur nombre et leur taille varie considérablement selon le type cellulaire et de son état de fonctionnement. Il faut voir ces compartiments comme autant de petites industries, ayant le monopole dans l'exécution d'une tâche bien précise. Par exemple, le RE synthétise les protéines membranaires et de nombreux lipides, les lysosomes dégradent les protéines et les mitochondries produisent l'énergie chimique de la cellule.

L'intérêt majeur de la compartimentation est donc la division du travail dans la cellule. Cependant, une organelle donnée ne fournit pas un 'produit fini'. Ainsi, la mise à profit du travail effectué par chaque organelle, passe par leur collaboration et donc le transport de matériel entre les compartiments. Il existe de ce fait des voies de transport dans la cellule qui relient les compartiments entre eux, leur permettant de travailler en série. On distingue deux

	PC (mol%)	PE (mol%)	PS (mol%)	PI, PIP, PIP2 (mol%)	SM (mol%)	Cholestérol/ phospholipide (mol/mol)
RE	58	25	3	10	10	0,08
Golgi	50	20	6	12	8	0,16
membrane plasmique	39	23	9	8	16	0,35

Tableau 2 : Composition lipidique des membranes le long de la voie sécrétoire. Les valeurs proviennent de mesures effectuées sur des cellules de foie de rat. Notons les gradients inversés de PC et de SM. (D'après van Meer, 1998).

grandes voies : Les voies antérograde et rétrograde (figure 9). La première est aussi appelée voie sécrétoire ou encore d'exocytose. En partance du RE et en passant par l'Appareil de Golgi, la voie sécrétoire permet l'acheminement et la maturation de lipides et de protéines qui sont sécrétées dans le milieu extérieur à partir de la membrane plasmique, ou localisées dans les différentes organelles. La voie rétrograde en revanche, régule les interactions cellulaires avec son environnement par l'endocytose, en internalisant des molécules du milieu extérieur par invagination de la membrane plasmique. Ces vésicules se dirigent vers les endosomes, qui à leur tour, communiquent avec le Golgi, etc.

Le transport de protéines et de lipides entre les organelles à travers ces deux voies bidirectionnelles se fait par un processus appelé trafic vésiculaire : Une vésicule de transport bourgeonne à partir d'un compartiment donneur, et fusionne avec un compartiment cible (ou accepteur) après avoir migré sur une certaine distance dans le cytosol. Ainsi, par un mécanisme dynamique, ces vésicules conduisent des composants membranaires et lumenaux depuis une organelle jusqu'à une autre, et ce à chaque étape de transport. En fait, une réelle 'vague' moléculaire traverse la cellule en ~15 minutes par le flux membranaire de la voie sécrétoire.

La régulation du flux vésiculaire, et en particulier celui du Golgi, implique beaucoup des protéines périphériques dépourvues de domaines transmembranaires. Ces protéines reconnaissent directement la membrane sur laquelle elles agissent, en se liant sur des lipides spécifiques à sa surface, ou à d'autres protéines déjà ancrées. Certaines protéines sont sensibles à la structure biophysique de la membrane, comme par exemple à son niveau de compaction, sa flexibilité, etc. Notons que ces paramètres doivent être maintenus, malgré le flux incessant de membranes le long des voies d'exocytose et d'endocytose. Regardons plus précisément la distribution lipidique des membranes cellulaires, qui détermine l'identité des organelles.

De façon importante, toutes les membranes de la cellule contiennent un mélange lipidique globalement similaire : Elles sont constituées essentiellement de PC, qui est le phospholipide le plus abondant, de PE, PS, PI, SM et de cholestérol. Cependant, il existe un gradient de ces lipides le long de la voie sécrétoire, c'est-à-dire depuis le Réticulum Endoplasmique (RE) jusqu'à la membrane plasmique (tableau 2). Ce gradient s'explique essentiellement par leur transport le long de cette voie, et en une moindre mesure par le métabolisme lipidique local. En revanche, la raison qui conditionne la localisation précise de tel ou tel lipide dans la cellule n'est pas clairement définie. Ce motif est vraisemblablement

multifactoriel, et pourrait inclure l'affinité des lipides entre eux, ou encore l'affinité de lipides pour des protéines intégrales présentes dans certains compartiments, mais aussi leur prise en charge (ou non) par des protéines et/ou des vésicules de transport. Par exemple, la SM est produite dans le Golgi, mais elle est deux fois plus abondante dans la membrane plasmique que dans son compartiment d'origine. De plus, la SM est deux fois plus abondante dans la membrane plasmique que dans le RE, suggérant que ce lipide est préférentiellement incorporé dans la voie antérograde depuis le Golgi et/ou écarté de la voie rétrograde. Le taux de cholestérol varie lui aussi considérablement : Il passe de 8 mol% dans le RE (où il est synthétisé) à plus de 35 mol% dans la membrane plasmique. La faible concentration du cholestérol dans le RE pourrait provenir de sa forte affinité pour la SM qu'il rencontre dans le Golgi, empêchant ainsi son recyclage vers le RE et le conduisant avec elle à la membrane plasmique (Sprong et al., 2001). Le PC qui est produit également dans le RE, reste en revanche très concentré dans cette organelle, à hauteur de 60 mol% des lipides totaux. Alors que son taux chute à 25 mol% dans la membrane plasmique en moyenne. Le PS, bien que de teneur membranaire modérée par rapport aux autres lipides, s'enrichit progressivement le long de la voie sécrétoire, pour atteindre dans la membrane plasmique, trois fois le taux qu'il occupe dans le RE (van Meer, 1998). Ainsi, pour certaines lignées fibroblastiques humaines, la membrane plasmique possède la moitié des phospholipides et jusqu'à 90% du cholestérol et de la sphingomyéline cellulaire (Lange et al., 1989). De façon intéressante, il existe aussi un gradient cellulaire dans la saturation des lipides. En effet, les lipides dans le RE sont généralement plus insaturés qu'ailleurs dans la cellule : Le PC et le PS contiennent respectivement 49% et 75% d'acides gras insaturés dans ce compartiment, alors que leur saturation s'élève dramatiquement dans la membrane plasmique, où ces mêmes taux passent à 30% et 11%.

Bien sûr, ces aspects quantitatifs sont étroitement corrélés à l'apparence physique des membranes : En fin de voie sécrétoire, c'est-à-dire pour les compartiments 'post-golgiens' (dont la membrane plasmique), la richesse en cholestérol et en lipides ayant des acides gras saturés, ordonne les membranes et leur apporte plus de rigidité. En revanche, le RE qui est pauvre en cholestérol et sphingomyéline, mais riche en acides gras insaturés, possède une organisation membranaire plus désordonnée et moins compacte que la membrane plasmique. Ainsi, la membrane du RE peut être considérée comme 'jeune', en faisant référence à sa souplesse et à ses lipides fraîchement synthétisés, à la différence d'une membrane plasmique 'vieille', plutôt caractérisée par sa raideur. D'autre part, l'organisation ordonnée des membranes post-golgiennes leur fournit moins de perméabilité et plus d'épaisseur que les

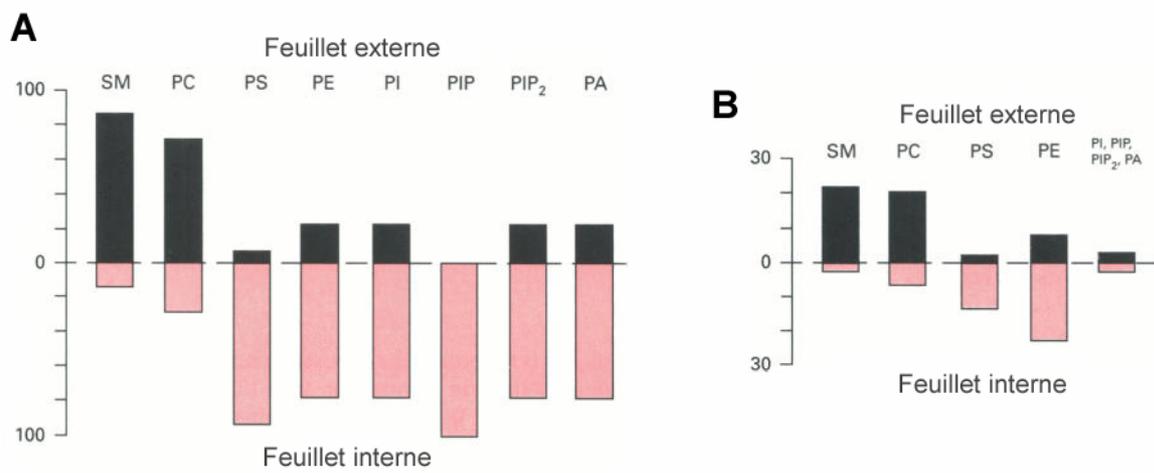


Figure 10 : Distribution asymétrique des phospholipides de la membrane plasmique (érythrocyte humain). **A.** La distribution (%) dans les feuilletes est observée pour les lipides individuellement. **B.** La distribution donne le pourcentage du total des lipides. (D'après Zachowski, 1993).

membranes du RE. En effet, du cis-Golgi au RE, les membranes ont une épaisseur de 5 nm, alors qu'elle est de 7 à 8 nm pour la membrane plasmique et le réseau trans-Golgien (Maxfield and Tabas, 2005; Orci et al., 1996).

Une caractéristique frappante qui différencie encore une fois les compartiments pré-golgiens des compartiments post-golgiens, est l'asymétrie lipidique transversale de leurs membranes : Si la membrane du RE possède une distribution lipidique plutôt symétrique entre son feuillet interne et son feuillet cytosolique, ce n'est pas le cas pour la membrane plasmique (figure 10). En effet, celle-ci concentre 65 à 75% de son PC et plus de 85% de sa SM dans son feuillet externe, alors que 80 à 85% de son PE et plus de 96% de son PS pointent côté cytosolique (Zachowski, 1993). De plus, les phosphoinositides, bien que faiblement représentés, sont localisés principalement (entre 80% et 100%) sur le feuillet cytosolique. L'aspect asymétrique des membranes est établi lors de la synthèse des lipides, mais serait également assuré à la membrane plasmique par certains transporteurs trans-membranaires protéiques consommant de l'énergie, comme les transporteurs ABC ou les protéines NPC1 (Sprong et al., 2001). Quoiqu'il en soit, cette distribution asymétrique n'est pas sans conséquences sur les propriétés biophysiques des membranes. Premièrement, la charge globale de la membrane plasmique, fournie essentiellement par le PS, est totalement déplacée sur son feuillet cytosolique, créant ainsi la surface membranaire la plus électronégative de la cellule. Ceci a une incidence majeure pour la localisation cellulaire de certaines protéines périphériques, se liant sur la membrane de manière non spécifique par des interactions électrostatiques, nous en reparlerons. Deuxièmement, le feuillet externe de la membrane plasmique, caractérisé par une forte concentration de SM et de PC à chaînes grasses saturées, combiné avec un taux élevé de cholestérol, serait dans un état très proche de la phase l_o , accordant ainsi la formation transitoire ($< 0,1$ ms) de microdomaines de phase l_o . Seule la coïncidence de facteurs non lipidiques, comme par exemple des protéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), bien localisés avec l'émergence de ces microdomaines permettrait l'augmentation de leur durée de vie (Hancock, 2006). Cependant, étant donné la vitesse de diffusion des lipides et des protéines ancrées dans la membrane, la membrane plasmique toute entière pourrait également être considérée comme un unique '*raft*'.

En résumé, les lipides majoritaires de la cellule (PC, PE, PS, SM et cholestérol) s'organisent dans les membranes de manière à former un gradient continu le long de la voie sécrétoire, et ceci pèse fortement sur l'aspect physique de la membrane de ces compartiments. Cependant, cette organisation lipidique n'assigne pas d'identité précise à ces différentes

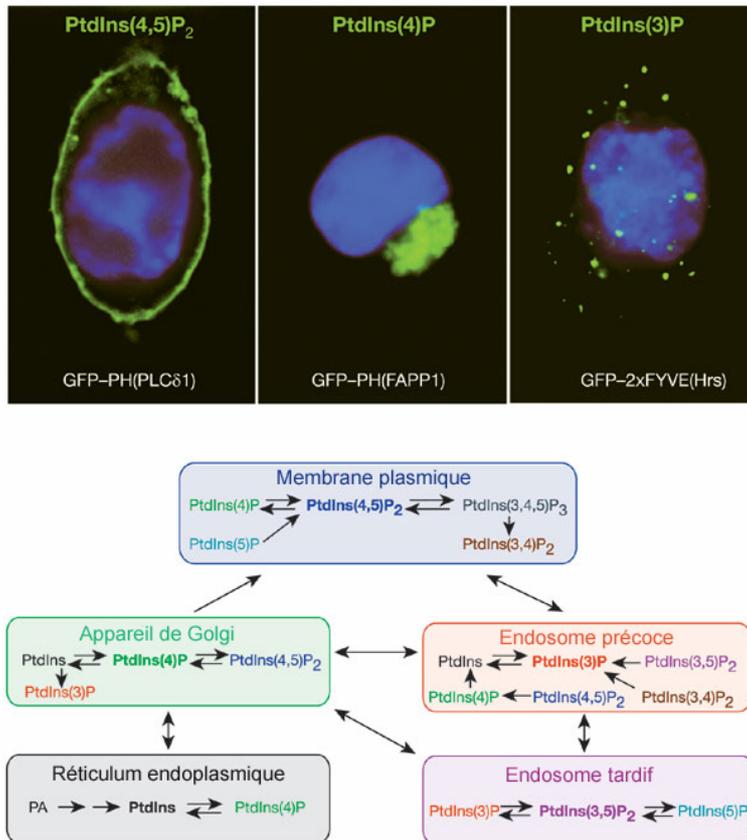


Figure 11 : La distribution subcellulaire des phosphoinositides. Les images de microscopie illustrent la principale localisation de certains phosphoinositides. Leur répartition est révélée par des domaines protéiques spécifiques. Les domaines protéiques sont fusionnés avec la protéine fluorescente GFP (vert), permettant de les visualiser. Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (bleu). Le domaine PH de la PLC δ 1 reconnaît le PI $_{(4,5)}$ P $_2$ et marque la membrane plasmique ; le domaine PH de FAPP1 reconnaît le PI $_{(4)}$ P et marque le Golgi ; deux domaines FYVE en tandem de la protéine Hrs reconnaissent le PI $_{(3)}$ P sur les endosomes. Le diagramme résume la localisation prédominante dans la cellule des phosphoinositides. Les flèches indiquent les événements de phosphorylation et de déphosphorylation qui interviennent dans chaque organelle. (D'après Di Paolo et al., 2006).

organelles. Or, certains lipides ne sont distribués que très localement, sur un petit nombre de membranes, fournissant une signature unique à chaque organelle. Ces lipides sont tous dérivés du PI, ce sont les phosphoinositides.

Le PI est synthétisé dans le RE et est ensuite transporté sur d'autres compartiments où il subit des phosphorylations réversibles sur son cycle inositol, générant ainsi sept espèces possibles de phosphoinositides. Le PI ne représente que 15% des lipides de la cellule, mais les phosphoinositides sont encore dix fois moins abondants, le PI_{(4)P} et le PI_{(4,5)P₂} constituant la majorité de ces lipides (Di Paolo and De Camilli, 2006). Chacune des sept espèces possède une répartition subcellulaire précise (figure 11) : La voie d'endocytose est marquée par le PI_{(3)P} et par le PI_{(3,5)P₂}. Le premier est localisé dans les endosomes précoces, et est utilisé comme substrat pour la synthèse du second, retrouvé dans les endosomes tardifs et/ou les lysosomes. La voie sécrétoire, et en premier lieu l'Appareil de Golgi, est caractérisée par la présence de PI_{(4)P}. Ce lipide est également retrouvé dans la membrane plasmique, où il devient PI_{(4,5)P₂} par phosphorylation. Ces deux lipides de la membrane plasmique peuvent être phosphorylés par une 3-kinase en réponse à un signal extérieur, pour donner les lipides PI_{(3,4)P₂} et PI_{(3,4,5)P₂} qui sont des seconds messagers de ce signal. Enfin, le PI_{(4,5)P₂} peut être clivé pour générer du DAG et de l'I_{(1,4,5)P₃} qui sont également des seconds messagers (Behnia and Munro, 2005; Di Paolo and De Camilli, 2006).

Le trafic vésiculaire est un flot incessant et multidirectionnel de membranes à travers la cellule. Ce large flot est habilement contrôlé par de nombreuses protéines périphériques régulatrices, qui reconnaissent le bon compartiment au bon moment. Paradoxalement, cette reconnaissance dépend peu des lipides majoritaires de la membrane, qui participent finalement à sa structure physique globale, mais en revanche relève plus de sa chimie fine, c'est-à-dire des phosphoinositides. Ces lipides ont certaines qualités :

- Premièrement, la distribution spatiale des phosphoinositides peut être contrôlée aisément compte tenu de leur caractère versatile. En effet, d'innombrables phosphatases et kinases spécifiques modifient les phosphoinositides, permettant par exemple aux vésicules de perdre rapidement leur identité après avoir bourgeonné d'un compartiment. Bref, un phosphoinositide donné n'a jamais une longue durée de vie, mais certains d'entre eux doivent préexister sur une membrane avant que d'autres ne soient générés, de même, la dégradation des uns en engendre d'autres, etc. Il convient que ces interrelations métaboliques soient extrêmement dynamiques, car bien entendu le trafic vésiculaire en dépend.

- De plus, la tête polaire des phosphoinositides est très volumineuse par rapport aux autres lipides. Ainsi, faisant ‘une tête de plus’ que les autres, même en faible nombre à la surface d’une membrane, ces lipides peuvent être facilement repérés par des protéines périphériques spécifiques. Ce type d’interaction est discuté dans le prochain chapitre.

En conclusion, une membrane biologique est une structure lipidique dynamique, ayant par ses propriétés physico-chimiques, la capacité de cloisonner certaines parties du cytoplasme d’une cellule. Les organelles résultantes possèdent chacune une sorte de carte d’identité, qui découle directement de leur nature lipidique. En effet, il existe dans la cellule un nombre incroyable de lipides, qui par leur taille, leur forme géométrique ou leur taux d’insaturation, conditionnent la fluidité, l’épaisseur mais aussi la malléabilité d’une membrane. Ces aspects physiques sont couplés à une chimie beaucoup plus discrète des organelles, caractérisée par des lipides rares, les phosphoinositides, qui occupent pourtant une place importante dans la régulation membranaire de la cellule. Les protéines périphériques se lient à un compartiment donné en fonction de leurs sensibilités à un profil physico-chimique membranaire particulier. Ce profil lipidique peut persister dans le temps, comme il peut être éphémère, et ainsi participer activement à la régulation spatiotemporelle des interactions protéines/membranes d’un compartiment.

CHAPITRE II :

LES INTERACTIONS
PROTEINES-MEMBRANES

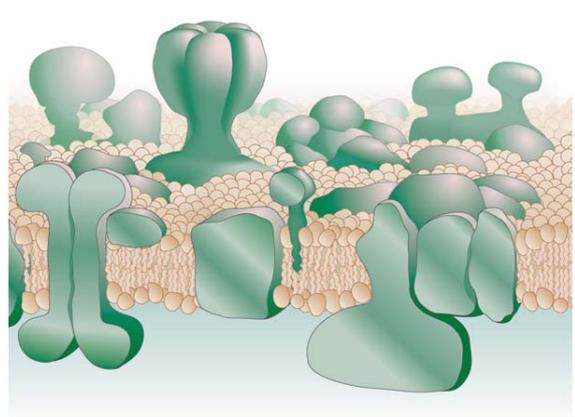
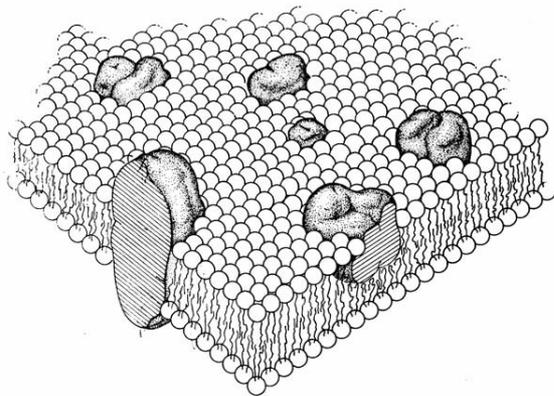


Figure 12 : A gauche : modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson (1972). A droite : modèle actuel (d'après Engelman, 2005).

Les interactions protéines-membranes

Vingt ans après le modèle de Gorter et Grendel, avec l'apparition de la microscopie électronique, Davson et Danielli proposent un modèle membranaire incluant pour la première fois des protéines : Il s'agit d'un sandwich de lipides recouvert de part et d'autre d'une couche de protéines. Ce modèle est accepté à l'époque et tient bon jusqu'à la fin des années 60, où fleurissent une multitude de modèles, tous dominés par celui de mosaïque fluide proposé par Singer et Nicolson (Bretscher, 1973; Singer and Nicolson, 1972).

Dans ce modèle, la membrane biologique est décrite comme une mer de lipides organisés en bicouche, sur laquelle 'flotte' de manière aléatoire un ensemble hétérogène de protéines globulaires traversant la membrane entièrement ou partiellement (figure 12). Cette structure mosaïque fluide serait d'après les auteurs analogue à une solution bidimensionnelle de protéines, avec pour solvant la bicouche visqueuse de phospholipides (Singer and Nicolson, 1972).

Ce modèle a été d'une importance phénoménale dans le développement de nombreuses idées dans les 10 années qui ont suivi. Cependant, certains aspects de ce modèle sont corrigés aujourd'hui. Premièrement, Singer et Nicolson avançaient l'idée que les protéines sont dispersées, à faible concentration sur la membrane, et par conséquent que chacune d'elles possède une 'ceinture' hydrophobe directement en contact avec les lipides. Les données actuelles ont plutôt tendance à dire que la membrane est 'bondée' de protéines, ce qui favorise leur association (Engelman, 2005). De plus, nous savons qu'il existe une large diversité de lipides et de protéines, offrant une multitude d'interactions intermoléculaires, ce qui laisse peu de place à la distribution aléatoire du modèle de 1972. La grande hétérogénéité des membranes dans la cellule, ainsi que la régionalisation spécifique des lipides et des enzymes qui les métabolisent, régulent spatialement la distribution des protéines membranaires. D'autre part, nous avons vu que certains lipides, par leur métabolisme dynamique, n'apparaissent que furtivement à la surface de membranes. Ce signal éphémère, capté à temps par des protéines spécifiques, peut déclencher une cascade réactionnelle dans la cellule. Différentes voies cellulaires sont ainsi régulées de manière spatio-temporelle, par des interactions brèves et finement localisées, entre protéines et membranes.

Il faut opposer deux types de protéines qui interagissent avec les membranes : Les premières, dont je ne parlerai pas, dites membranaires intégrales, possèdent généralement un

ou plusieurs segments transmembranaires en hélices α hydrophobes qui traversent entièrement la membrane. Ces protéines sont des récepteurs, des pompes, des transporteurs, des canaux ioniques, ou bien des centres réactionnels comme le système de photosynthèse. Les protéines du deuxième type sont dites ‘périphériques’. Elles se lient de manière dynamique à la surface des membranes de diverses façons : Certaines protéines atteignent la membrane indirectement, en interagissant avec d’autres protéines déjà liées ou intégrales. En revanche, d’autres protéines se lient directement sur la membrane. Ces protéines peuvent, par exemple, être modifiées de façon covalente par un lipide, qui leur sert d’ancrage membranaire. Elles peuvent également utiliser leurs propriétés électrostatique et/ou hydrophobe pour interagir avec la membrane. Ces protéines ne possèdent pas forcément de domaines structurés prévus à cet effet, mais également des motifs flexibles, intrinsèquement non structurés, qui se fixent sur les têtes polaires des lipides, ou encore s’insèrent plus profondément dans la bicouche.

Je vais présenter ces différents types d’interaction entre protéines périphériques et membrane, en utilisant des exemples précis pour les illustrer. Prenons tout d’abord l’exemple d’un mécanisme de reconnaissance spécifique d’un phosphoinositide par une protéine.

1) La reconnaissance spécifique d’un lipide, ou le mécanisme ‘clé-serrure’

Les protéines périphériques sont riches en domaines modulaires leur permettant de se lier sur les membranes lipidiques. Par leur structure et leur physico-chimie, ces domaines (C1, C2, PH, PTB, PX, FYVE, ENTH, FERM) reconnaissent la tête polaire de lipides particuliers, répartis de façon précise dans les membranes des divers compartiments subcellulaires. J’ai choisi ici de présenter le cas du domaine FYVE, un petit domaine de 70 résidus, spécifique d’un lipide plutôt rare dans la cellule, le PI(3)P. Effectivement, le PI(3)P ne représente que 0,25% des phosphoinositides, qui déjà ne représentent guère plus de 15% des lipides cellulaires. Pour reconnaître sélectivement le PI(3)P, et non le PI(4)P par exemple, le mécanisme moléculaire de reconnaissance du domaine FYVE doit être particulièrement ingénieux.

Regardons d’abord la localisation cellulaire du PI(3)P. Ce lipide n’est synthétisé que sur les membranes des vésicules endosomales, comme les endosomes précoces, les phagosomes ou les MVBs (*multi-vesicular bodies*). La répartition exclusive de ce lipide représente en quelque sorte la ‘carte d’identité’ de ces compartiments. Cette identité est un véritable signal membranaire qui permet de coordonner spatialement le recrutement ou l’activation de

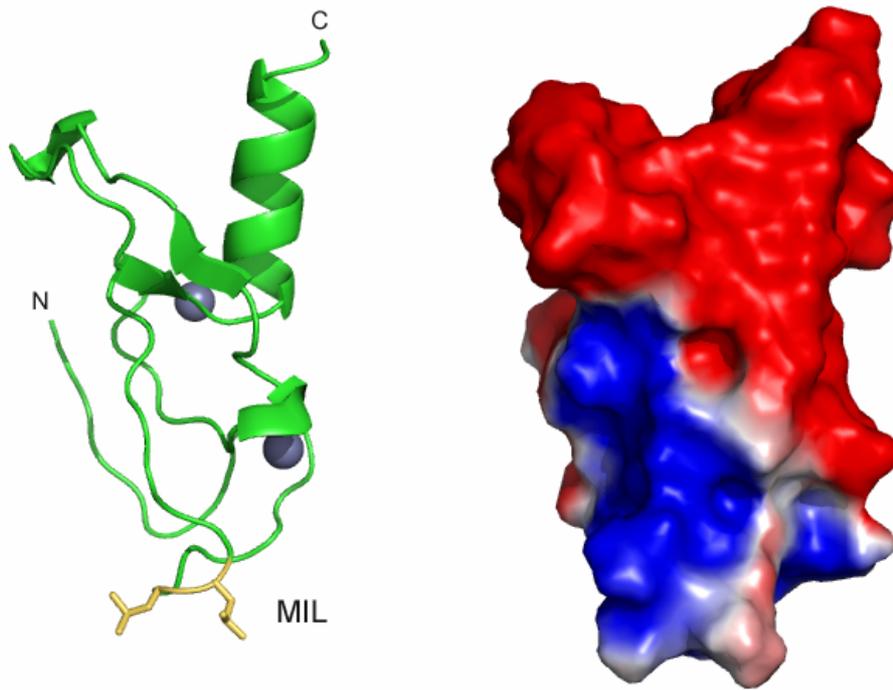


Figure 13 : Structure du domaine FYVE de la protéine Vps27p (Misra et Hurley, 1999). A gauche, les atomes de zinc sont modélisés par des sphères. Les résidus hydrophobes (leucines) de la boucle MIL sont mis en évidence. A droite, la surface moléculaire du domaine FYVE est colorée selon son potentiel électrostatique. Le site de liaison du PI_3P , ici sur le côté gauche de la molécule, est caractérisé par de nombreux résidus basiques.

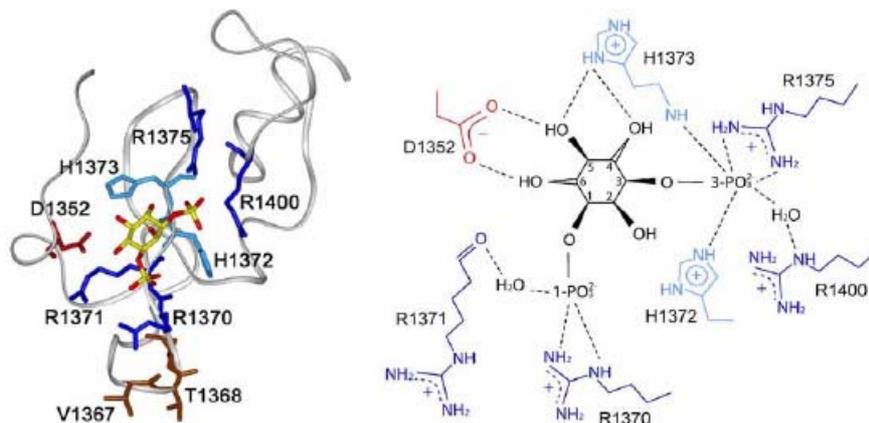


Figure 14 : Structure de la poche de liaison au PI_3P de la protéine EEA1 en complexe avec le 1,3-inositol diphosphate (Dumas et al., 2001), et représentation des ponts hydrogènes établis entre le domaine FYVE et le 1,3-inositol diphosphate. (D'après Kutateladze, 2006).

protéines effectrices contenant un domaine FYVE (figure 11). Les protéines possédant un domaine FYVE les plus caractérisées sont EEA1 et son homologue de levure Vac1p ; elles participent à la mise en place de la machinerie nécessaire à la fusion des endosomes, suite à leur interaction avec la petite protéine G Rab5 (Odorizzi et al., 2000). Notons qu'il existe de nombreuses autres protéines arborant un domaine FYVE, impliquées dans une variété de processus cellulaires, tel que le trafic vésiculaire ou encore le métabolisme lipidique, dans les cellules de mammifères comme chez la levure (Kutateladze, 2006).

La structure tridimensionnelle du domaine FYVE de la protéine Vps27p sans son ligand, a révélé un repliement caractéristique en double doigt de zinc, formant un site concave de liaison au PI(3)P, tapissé de résidus basiques et d'histidines (figure 13) (Misra and Hurley, 1999). Les données structurales sur la reconnaissance spécifique du PI(3)P par les domaines FYVE ont été apportées par les études cristallographiques et de RMN du domaine FYVE de EEA1 en complexe avec de l'inositol-1,3-biphosphate et du dibutanoyl-PI(3)P respectivement (Dumas et al., 2001; Kutateladze and Overduin, 2001). Trois séquences conservées, le motif WxxD en N-terminal, un motif central basique RR/KHHCR et enfin un motif C-terminal RVC, faisant partie du site de liaison concave du domaine FYVE, coordonnent la tête polaire du PI(3)P. Dans le motif RR/KHHCR, la fonction guanidine du résidu R1375, l'imidazole de H1372 et la fonction amide de H1373, établissent des liaisons hydrogènes critiques avec le phosphate en position 3 du PI(3)P (figure 14). Le phosphate en position 1 est ponté par le résidu R1370, et par R1371 à l'aide d'une molécule d'eau. De façon intéressante, d'autres résidus (D1352 et H1373) interagissent avec les groupes hydroxyles en position 4, 5 et 6 de l'inositol, ce qui permet d'expliquer la spécificité du domaine FYVE pour le PI(3)P, et l'exclusion d'autres phosphoinositides. En effet, seul un phosphate en position 3 n'est autorisé par la présence de ces résidus. Notons que les groupements imidazoles des deux histidines du motif RR/KHHCR doivent être chargés positivement pour assurer la fixation du domaine FYVE sur le PI(3)P. Or, le pKa de ces groupements est proche du pH physiologique. De ce fait, le pH cytosolique (pH = 7,3) ne permettrait en théorie qu'à la moitié des domaines FYVE de reconnaître le PI(3)P. Une étude récente montre effectivement que la liaison du domaine FYVE de EEA1 sur le PI(3)P des membranes est fortement modulée par le pH (Lee et al., 2005b). Les auteurs suggèrent que des variations de pH intracellulaire, intervenant par exemple lors de la croissance et du développement cellulaire, ou encore lors de l'apoptose, pourraient réguler la quantité de domaines FYVE susceptibles de reconnaître le PI(3)P.

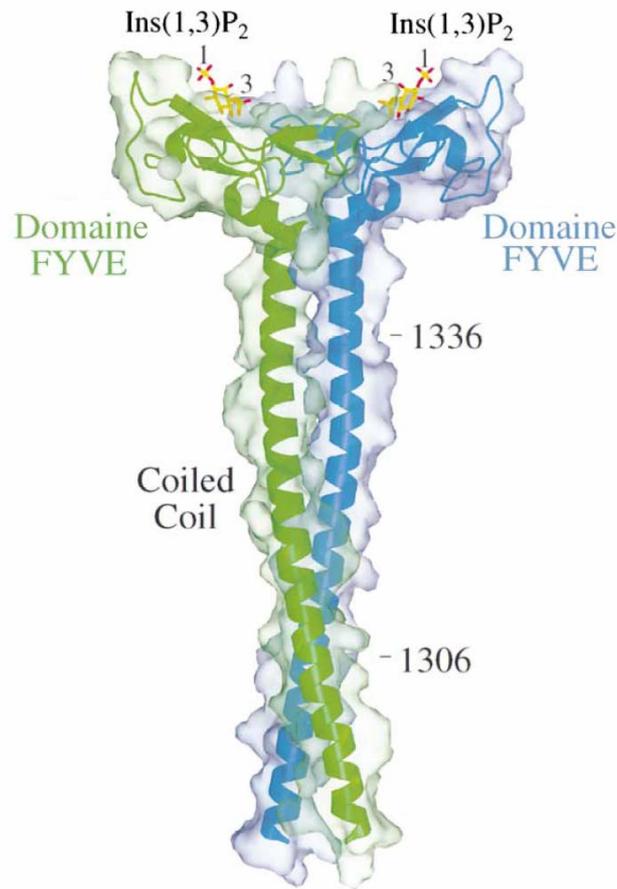


Figure 15 : Structure de la région C-terminale d'EEA1 sous forme homodimérique lié au 1,3-inositol diphosphate. La région structurée en coiled-coil se termine sur une dyade symétrique de domaines FYVE. Cette structure implique une double reconnaissance de PI_3P pour sa liaison. (D'après Dumas et al., 2001).

Malgré la rareté du PI(3)P dans la cellule, sa concentration locale sur les endosomes est relativement élevée (Stenmark and Gillooly, 2001). De ce fait, les domaines FYVE se lient sur ces membranes avec une bonne affinité. Toutefois, l'affinité d'un domaine FYVE pour la tête polaire d'un PI(3)P est remarquablement plus basse ; comme si d'autres interactions étaient requises pour affermir sa liaison membranaire (DiNitto et al., 2003). Plusieurs études indiquent en effet que des interactions hydrophobes et électrostatiques engageant des résidus en dehors du site de liaison au PI(3)P, contribuent à l'adsorption membranaire d'un domaine FYVE. L'insertion membranaire d'une paire de résidus hydrophobes exposés au sommet d'une courte boucle (appelée MIL ; *membrane insertion loop*) de la protéine de levure Vps27p, a initialement été suggérée (figure 13) (Misra and Hurley, 1999). L'adsorption membranaire de la boucle MIL (également appelée *Turret Loop*) de EEA1, analogue à celle de Vps27p, a été démontrée par la suite, par des expériences de RMN en présence de micelles de dodecyl-PC, et de liaison sur liposomes (Kutateladze et al., 1999; Sankaran et al., 2001).

Les propriétés électrostatiques de domaines FYVE de différentes protéines suggèrent que leur recrutement membranaire est facilité par des interactions électrostatiques non spécifiques. En effet, une région basique entourant la boucle MIL pourrait interagir avec les têtes polaires de phosphatidylsérine, un lipide anionique retrouvé dans les endosomes. Une étude de RMN révèle que l'affinité du domaine FYVE de EEA1 pour des micelles de dodecyl-PC enrichies en PI(3)P est trois fois plus élevée si elle comportent 10% de PS. De plus, ces interactions électrostatiques non spécifiques permettraient d'orienter le domaine FYVE correctement vis-à-vis de la membrane, pour que l'interaction spécifique avec le PI(3)P soit optimale (Kutateladze et al., 2004). Ainsi, la reconnaissance spécifique de la tête polaire du PI(3)P, l'hydrophobicité de la boucle MIL, et des interactions électrostatiques non spécifiques apportent la sélectivité d'une part, et la force de liaison d'autre part, pour emmener le domaine FYVE à la membrane des endosomes.

La localisation membranaire d'un grand nombre de protéines possédant un domaine FYVE est amplifiée lorsqu'elles dimérisent. Une construction synthétique contenant deux domaines FYVE de la protéine Hrs se lie avec plus d'efficacité aux membranes riches en PI(3)P qu'un domaine FYVE unitaire. Cette construction est d'ailleurs utilisée pour étudier la distribution du PI(3)P dans les cellules (Gillooly et al., 2000). La dimérisation de protéines à domaine FYVE peut se faire par l'intermédiaire d'une région coiled-coil de deux monomères, comme c'est le cas pour la protéine EEA1. La région coiled-coil d'EEA1 forme un homodimère parallèle, qui juxtapose ainsi deux domaines FYVE sur la membrane, pour interagir simultanément avec deux têtes polaires de PI(3)P (figure 15) (Dumas et al., 2001).

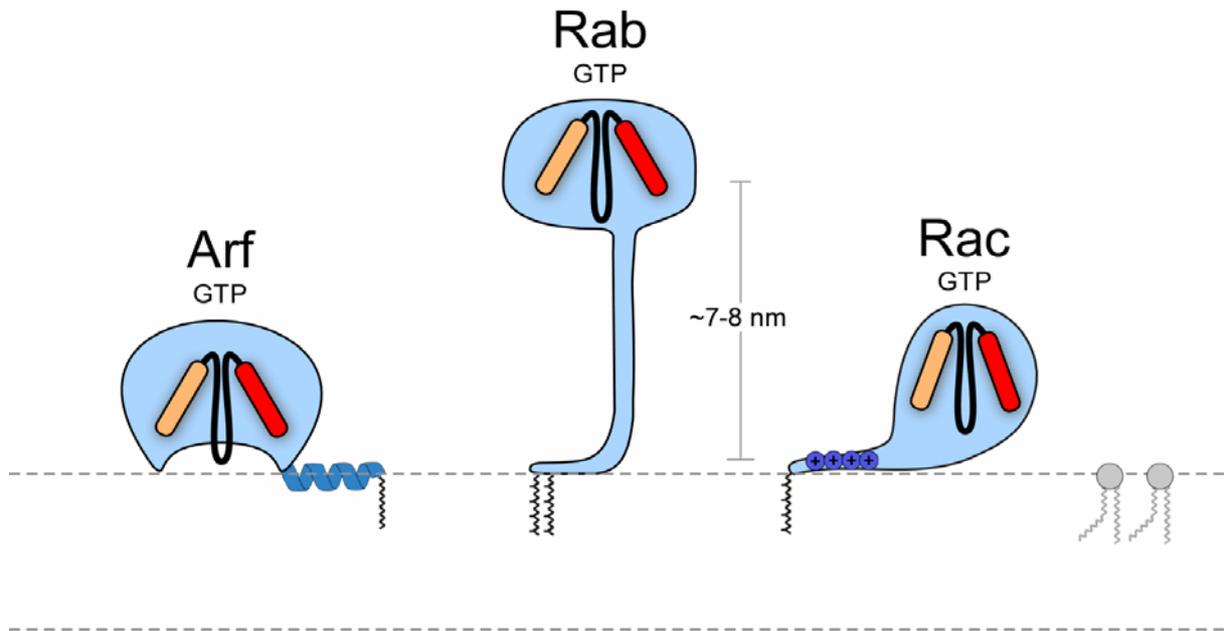


Figure 16 : Les petites protéines G : ‘variations sur un même thème’. Représentation des trois petites protéines G Arf, Rab et Rac sur une membrane. Ces protéines ont un cœur structural ‘minimal’ conservé et des régions variables qui assurent leur spécificité fonctionnelle.

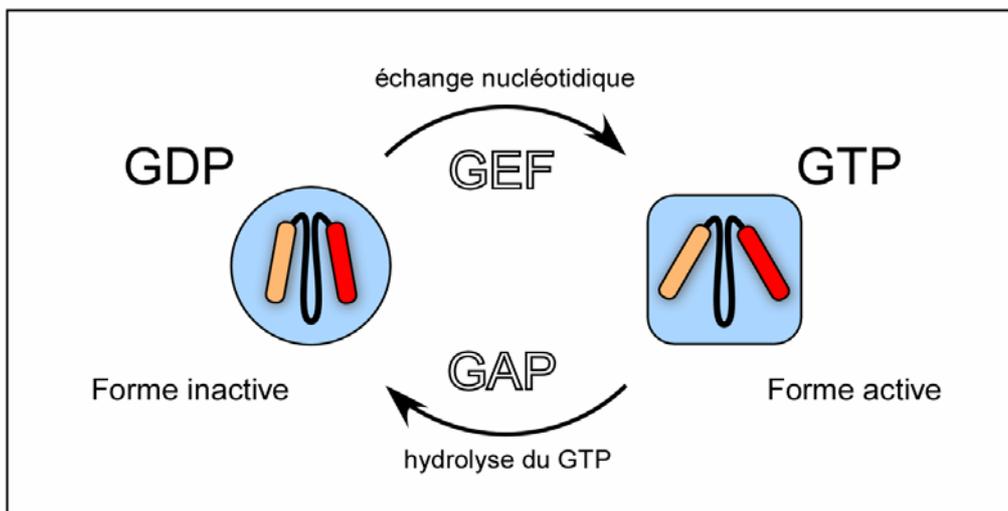


Figure 17 : Le cycle GDP/GTP des petites protéines G. La petite protéine G liée au GDP est inactive. L’échange du GDP en GTP catalysé par un facteur d’échange (GEF), induit un changement de conformation de régions appelées ‘switch’ (représentées en jaune et rouge), du fait de nouvelles coordinations déclenchées par le phosphate γ du GTP. Cette modification structurale de la protéine la rend active, car capable d’interagir avec des protéines effectrices. L’hydrolyse du GTP en GDP conduit à la désactivation de la petite protéine G. Cette réaction est catalysée par une protéine GAP (GTPase Activating Protein).

Bien que ce processus soit important pour la localisation membranaire de nombreuses protéines à domaine FYVE, la dimérisation n'est pas toujours obligatoire. En effet, les domaines FYVE isolés de certaines protéines qui se dimérisent, montrent la même avidité pour le PI(3)P que les protéines entières. De plus, il existe des protéines à domaine FYVE restant monomériques, même à concentration élevée (Kutateladze, 2006).

En conclusion, le mécanisme de reconnaissance lipidique 'clé-serrure' présenté ici a l'avantage d'être simple et efficace. Le domaine protéique FYVE est parfaitement adapté à la chimie fine de la tête polaire du PI(3)P, un lipide dont la distribution spatiale est très restreinte. La reconnaissance spécifique d'une tête polaire lipidique ne veut pas pour autant dire une forte affinité. Nous avons vu dans ce chapitre que d'autres sites d'ancrages membranaires non spécifiques contribuent à la liaison des domaines FYVE ; de plus cette liaison est facilitée par la dimérisation de ces domaines. Regardons maintenant le cas des petites protéines G, d'autres protéines qui jouent de leurs outils moléculaires pour s'attacher aux membranes.

2) Le cas des petites protéines G

Les petites protéines G sont à mon sens d'excellents exemples pour décrire ce qu'est une interaction protéine/membrane. D'abord, elles ont été largement étudiées depuis des décennies et nous disposons de ce fait de structures et de modèles très bien établis. Ensuite, ces protéines jouent de variations sur un même thème : Toutes les petites protéines G ont un cœur structural conservé, qui assure une fonction moléculaire de base : la bascule nucléotidique GDP/GTP. En revanche, les régions entourant ce cœur structural sont différentes d'une protéine à l'autre, leur permettent d'avoir des spécificités fonctionnelles extrêmement variées dans la cellule (figure 16). Ces protéines, d'à peine ~20kDa, possèdent des caractéristiques biochimiques surprenantes et leurs interactions avec les membranes sont directement reliées à leur fonction.

Les petites protéines G sont couramment qualifiées d'interrupteurs moléculaires, car elles enclenchent ou arrêtent des cascades de transduction de signaux par leur capacité à adopter deux conformations structurales. En effet, les petites protéines G tirent leur nom du nucléotide qu'elles portent : un nucléotide à guanine qui est alternativement le GTP (Guanoside tri-phosphate) ou le GDP (Guanoside di-phosphate), et c'est la liaison à l'un ou

l'autre de ces nucléotides qui dicte la structure ainsi que l'état d'activation de la protéine. Les bases moléculaires de la commutation GDP/GTP sont aujourd'hui bien établies, en particulier grâce aux travaux de cristallographie réalisés sur la petite protéine G Ras (Kjeldgaard et al., 1996). Deux régions appelées 'switch' changent de conformation lors de l'échange du GDP par un GTP, du fait des nouvelles coordinations permises par la présence du phosphate terminal de ce nucléotide. Liée au GTP, la protéine est à l'état actif, sa conformation lui permet de reconnaître des effecteurs et ainsi déclencher une cascade de signalisation. En revanche, la protéine est inactive lorsqu'elle est liée au GDP, ou plus précisément lorsque survient l'hydrolyse de son GTP en GDP. Ce cycle GDP/GTP est extrêmement régulé : Premièrement par des protéines qui contrôlent l'activation des protéines G en remplaçant le GDP par le GTP : Ce sont les GEF (Guanine nucléotide Exchange Factor) ; et par celles qui désactivent les protéines G en hydrolysant leur GTP : Ce sont les GAP (GTPase Activating Protein) (figure 17).

Je reviendrai longuement sur ce contrôle ainsi que sur les protéines GEF et GAP par la suite. Notons que la plupart des petites protéines G sont pourvues d'une activité intrinsèque d'hydrolyse de leur GTP, d'où leur nom commun de GTPases. Cependant certaines d'entre elles, comme Arf1, ne disposent que d'une activité intrinsèque réduite voire inexistante, c'est pourquoi nous préférons les appeler tout simplement 'petites protéines G'.

a) Les modifications lipidiques

Pratiquement toutes les petites protéines G possèdent au moins une modification lipidique qui leur est attachée de manière covalente. Si la nature de ce groupement carboné varie d'une protéine à l'autre, dans tous les cas il leur permet d'interagir avec une membrane lipidique. De plus, nous verrons que dans certains cas, l'interaction de l'ancre lipidique avec la membrane est renforcée par d'autres forces de liaison (électrostatique et hydrophobe) impliquant directement les acides aminés de la protéine. Ces propriétés de liaison membranaire sont essentielles pour la reconnaissance des petites G avec leurs effecteurs, car ces événements se produisent à la membrane. Prenons par exemple trois différentes petites protéines G : Arf1, Rac1 et Rab, et intéressons-nous tout d'abord à leur groupement lipidique.

Arf1 possède un myristate aminoterminal, c'est un acide gras saturé (acyl) en C14 qui lui est ajouté de manière co-translationnelle par une liaison amide sur sa glycine N-terminale par la NMT (Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase) après clivage de la méthionine

initiale par la MAP (Méthionine amino-peptidase) (Gordon et al., 1991). Ce clivage intervient pendant la traduction, la glycine-2 devenant ainsi l'acide aminé N-terminal. Ce processus est absolument nécessaire pour la reconnaissance de la NMT, mais le substrat protéique de la NMT est une séquence consensus (G₂,x,x,x,S/T,K/R), indiquant que des résidus en aval de la glycine sont également reconnus (Resh, 1999).

A l'inverse d'Arf1 qui est acylé par un myristate, Rac1 est prénylé. Il existe deux types de prénylation : la farnésylation (15 carbones), et la plus commune : la géranylgeranylation (20 carbones). La prénylation est une modification covalente post-traductionnelle reliée à une cystéine C-terminale de la protéine par une liaison thioether très stable. Cette liaison est catalysée par l'enzyme FTase (farnésyltransférase) ou par la GGTase-I (géranylgeranyltransférase-I) selon le cas (Casey and Seabra, 1996; Seabra et al., 1991). En effet, ces deux métalloenzymes à zinc, très proches pour l'une de leurs deux sous unités (30% d'identité), reconnaissent une séquence consensus à l'extrémité C-terminale de la protéine : La boîte CaaX (C étant la cystéine en question, aa étant deux résidus aliphatiques et X n'importe quel acide aminé excepté la proline). La nature du résidu X permet la reconnaissance spécifique de la séquence par l'une ou l'autre enzyme. La prénylation est suivie par le clivage des résidus aaX puis par une carboxyméthylation. Ces réactions sont catalysées respectivement par deux enzymes transmembranaires du réticulum endoplasmique conservées depuis la levure: Rce1p (CaaX-protéase) et Ste24p/Icmt (Isoprenylcysteine carboxyl méthyltransférase) (Philips et al., 1993; Schmidt et al., 1998).

La majorité des protéines de la famille Rab sont différentes des deux précédentes car elles portent une double modification lipidique. En effet, ces protéines Rab possèdent un motif di-cystéine en C-terminal tel que CC, CXC ou CCXX où les deux cystéines sont modifiées par des groupements lipidiques géranylgeranyl. L'enzyme permettant cette modification est la GGTase-II (ou RGGT). A la différence des prényl transférases que nous avons vues précédemment, cette enzyme ne modifie Rab qu'en complexe avec une protéine d'escorte : REP (Rab escort protein). Suite à leur double géranylgeranylation, les protéines Rab possédant un motif CXC (et non un motif CC) sont carboxy-méthylées sur leur prényl-cystéine C-terminale, toutefois le rôle de cette méthylation reste obscur (Smeland et al., 1994).

Les modifications lipidiques qui interviennent sur ces différentes petites protéines G sont diverses. Ces variations concernent leur longueur, leur chimie, mais aussi leur nombre.

Ces différentes caractéristiques influent considérablement sur la liaison membranaire des protéines qui les portent :

Le myristate que porte Arf1 est un acide gras relativement court, et sa chimie fait que sa pénétration dans la membrane est peu profonde. McLaughlin montre que la constante de dissociation membranaire d'un myristate greffé sur une Glycine est de 10^{-4} M, soit à peine assez d'énergie pour être fixé. De ce fait, à lui seul le myristate n'est pas assez fort pour attacher Arf1 de manière stable à la membrane (Peitzsch and McLaughlin, 1993; Resh, 1999). Une étude intéressante sur la partition eau/membrane d'un peptide selon la longueur de sa chaîne lipidique, montre que le remplacement d'un myristate par un palmitate, soit l'addition de deux groupements méthyle, augmente 10 fois son affinité de liaison membranaire (Shahinian and Silvius, 1995). Ainsi, l'affinité pour la membrane augmente avec la longueur du groupement lipidique.

Rac1 possède une géranylgeranylation. La chimie de ce long groupe carboné diffère de l'acyl en plusieurs points : D'abord, le géranylgeranyl ne possède pas de fonction carboxyle « polaire » en début de chaîne, ensuite il porte des insaturations et est « branché ». Des études de partition membranaire réalisées sur des peptides prenylés montrent que le géranylgeranyl apporte 45 fois plus d'affinité pour les membranes que le farnésyl (200-800 nM contre 5-40 μ M) qui possède une chaîne plus courte (Silvius and l'Heureux, 1994). D'autre part, la méthylation C-terminale supplémentaire augmente 10 à 40 fois l'affinité membranaire de ces peptides. Notons que cette méthylation est réversible dans des conditions physiologiques (Chelsky et al., 1985). Un peptide géranylgeranylé et carboxyméthylé montre pourtant des cinétiques de dissociation membranaire très rapides (malgré une 'forte' liaison dans le sens thermodynamique), ce qui n'est pas compatible avec une attache membranaire solide et de longue durée. Ainsi, comme pour Arf1, nous verrons que Rac1 nécessite un moyen de liaison supplémentaire pour se fixer efficacement à la membrane.

Les deux modifications géranylgeranyl que possèdent les protéines Rab les rendent énormément hydrophobes. En effet, à l'inverse d'une monoacylation ou d'une monoprénylation, dont l'association membranaire est rapidement réversible, la présence d'une seconde chaîne lipidique sur Rab la conduit à être réellement 'piégée' par la membrane. Les demi-vies de transfert spontané de peptides doublement géranylgeranylés entre deux bicouches vont de plusieurs heures à plusieurs jours (Shahinian and Silvius, 1995). Donc, à l'inverse d'Arf1 et de Rac1, tout porte à croire que seules les modifications lipidiques que subissent les protéines Rab, sont nécessaires et surtout suffisantes pour les séquestrer à la membrane.

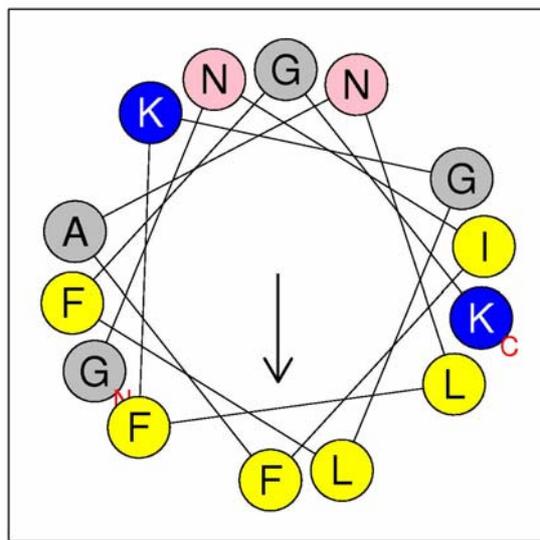


Figure 18 : Projection en hélice α des 15 premiers résidus d'Arf1. La ségrégation des résidus polaires d'une part et des résidus hydrophobes (en jaune) d'autre part, indique qu'il s'agit d'une hélice amphipathique.

b) Les autres sites d'ancrages

Comme nous l'avons vu, la myristoylation d'Arf1 est un ancrage lipidique plutôt faible. De même la géranylgéranoylation de Rac1 ne suffit pas pour le lier solidement à la membrane. Quelles sont alors les autres propriétés d'ancrage que possèdent ces deux protéines pour se fixer sur la membrane de façon correcte et fonctionnelle? Pour répondre à cette question, regardons les séquences et les structures de ces protéines, en commençant par celles d'Arf1.

Juste en aval de sa glycine myristoylée, Arf1 possède une séquence intéressante:

myr-G₂N**IFANL****FKGL****FGK**₁₅

Elle présente une répétition de résidus hydrophobes (en jaune), avec une périodicité de 3 résidus, espacés de résidus polaires. Ceci suggère que ce peptide est un hélice amphipathique (figure 18) (Antony et al., 1997a). Les hélices amphipathiques sont des structures secondaires retrouvées assez fréquemment dans les protéines. Ces hélices leur permettent de se lier de manière réversible sur des membranes, sans sélectivité stricte envers les lipides. Cette structure permet la séparation des résidus polaires et des résidus hydrophobes, sur deux faces distinctes de l'hélice. Le repliement en hélice s'adapte ainsi parfaitement à l'interface eau/membrane. L'axe de l'hélice s'enfonce dans la membrane parallèlement à son plan, et descend en moyenne jusqu'au niveau du glycérol des lipides. Ainsi, les résidus hydrophobes sont encastrés entre les chaînes grasses des lipides, tandis que leurs têtes polaires sont en contact avec les acides aminés polaires de la protéine. De manière sélective, la prédominance de lipides à têtes polaires anioniques dans la cellule, conduit ces hélices à porter des résidus basiques sur leur face polaire, favorisant la création d'interactions électrostatiques (Cornell and Taneva, 2006). En ce sens, Arf1 possède deux résidus lysine (en bleu), chargés positivement. Je reparlerai de ces structures secondaires dans la quatrième partie de cette thèse.

La structure de la protéine Arf1 dans sa conformation inactive, liée au GDP, montre que cette hélice N-terminale est enfoncée dans une dépression hydrophobe à la surface de la protéine, les résidus hydrophobes étant tournés vers l'intérieur de la protéine (figure 19) (Amor et al., 1994; Greasley et al., 1995). En accord avec cette structure, Arf1-GDP est

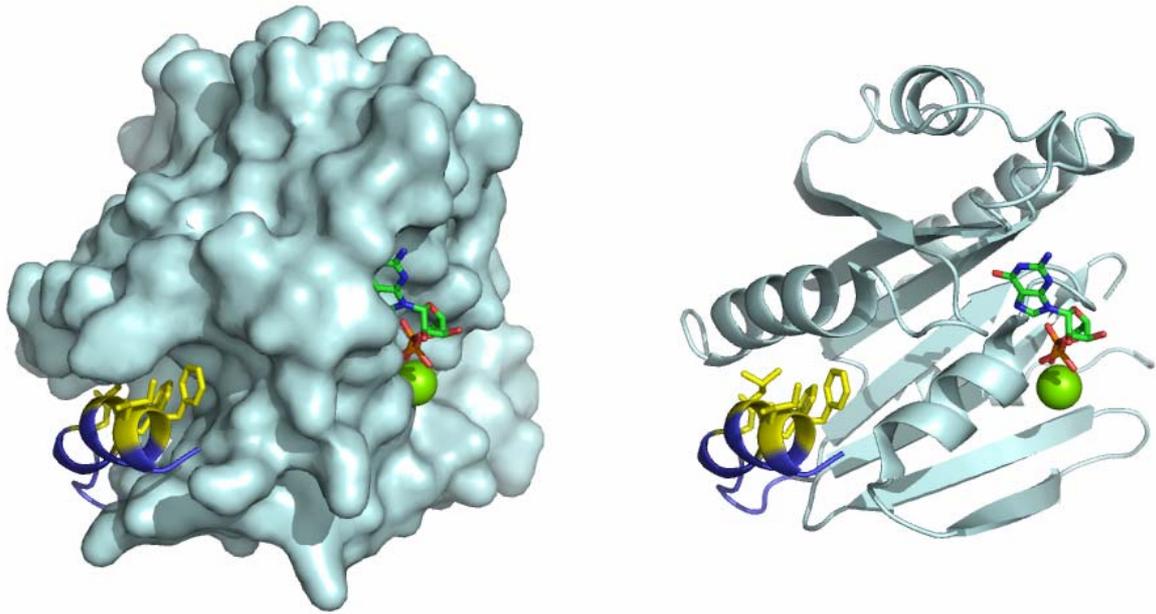


Figure 19 : Structure d'Arf1-GDP sans myristate (Amor et al., 1994). Les résidus hydrophobes (en jaune) de l'hélice N-terminale amphipathique sont tournés vers l'intérieur d'une dépression hydrophobe lorsque la protéine est inactive. Le GDP et l'atome de magnésium sont également représentés.

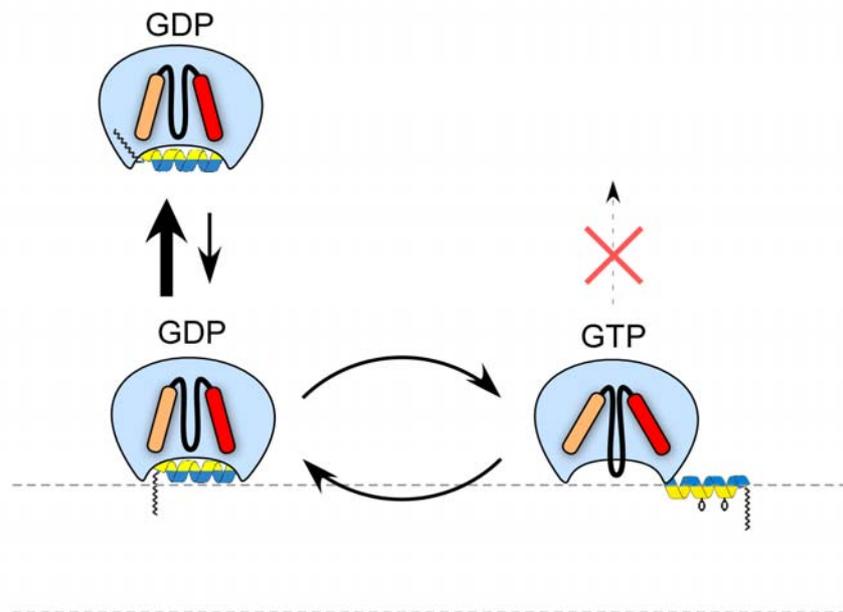


Figure 20 : Interactions entre Arf1 et la membrane. Arf1-GDP est principalement cytosolique et interagit faiblement avec la membrane. Arf1-GTP possède en revanche une forte affinité pour la membrane, du fait de la bascule de son hélice amphipathique depuis la dépression hydrophobe vers la membrane.

principalement cytosolique (Walker et al., 1992). En effet, dans cette conformation, les résidus hydrophobes ne peuvent interagir avec les lipides de la membrane, et seul le myristate peut tenter une approche membranaire, mais il trop faible pour qu'Arf1 y perdure (figure 20). En revanche, Arf1 activé, lié au GTP, forme une interaction de haute affinité avec les phospholipides des membranes, impliquant que la liaison membranaire de la protéine soit couplée au changement de conformation induit par l'échange GDP/GTP (Franco et al., 1995; Walker et al., 1992). Un modèle suggère alors que, lors de cet échange, l'hélice N-terminale portant le myristate quitte la dépression hydrophobe et bascule vers la membrane en y insérant ses résidus hydrophobes. Ceci est démontré par le temps de dissociation relativement élevé ($\tau_{\text{off}} \approx 75$ s) observé pour Arf1-GTP γ S à partir de membranes lipidiques neutres. Ceci ne peut être attribué au myristate seul et exclut l'influence 'exagérée' d'interactions électrostatiques dans cette liaison. Ainsi, l'étroite association entre le myristate et les résidus hydrophobes de l'hélice amphipathique N-terminale permet une fixation robuste d'Arf1 sur la membrane (Antonny et al., 1997a). Le mécanisme moléculaire de la bascule GDP/GTP de la protéine Arf1 sera détaillé dans le chapitre suivant.

Nous l'avons vu précédemment, un peptide géranylgeranylé et carboxyméthylé montre des vitesses de dissociation très rapides. Est-ce que comme Arf1, la protéine Rac1 possède plusieurs signaux d'ancrage, lui offrant plus de stabilité à la membrane?

Regardons dans un premier temps la séquence précédant la modification C-terminale de Rac1 :

₁₇₄RAVLCPPCKKRKRKC₁₈₉-ger

Cette séquence est particulièrement riche en résidus positivement chargés (en bleu), ce qui lui procure une force électrostatique importante. Ceci se traduit par une attirance pour des membranes possédant des lipides anioniques en abondance, comme la membrane plasmique. Notons que d'autres protéines, dont des petites protéines G des familles Ras et Rho, possèdent ce même type de signal de localisation membranaire à proximité d'une modification lipidique (Murray, 2002). On parle généralement de « bras polybasique » pour qualifier ces séquences, du fait de leur richesse en résidus basiques et de leur flexibilité relative, introduite par des prolines. A l'image du N-terminal de Src, on peut penser que pour Rac1, les contributions individuelles d'énergie de liaison (électrostatique venant du bras polybasique, et hydrophobe

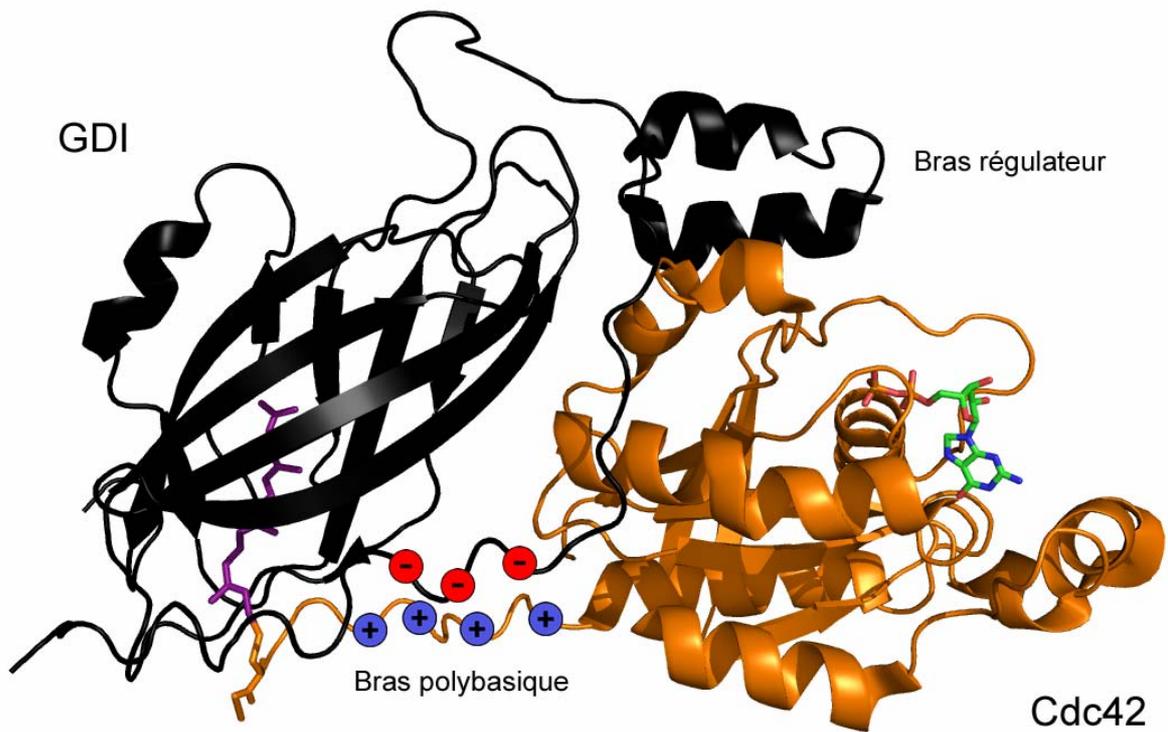


Figure 21 : Structure du complexe entre Cdc42-GDP et GDI (Hoffman et al., 2000). A l'extrémité C-terminale de Cdc42, le géranylgeranyl (violet) plonge dans la gorge hydrophobe de GDI. Dans ce complexe, le bras C-terminal polybasique de Cdc42 est à proximité d'une région de GDI riche en résidus anioniques. Le bras régulateur de GDI interagit avec les régions switch de Cdc42. De ce fait, ces protéines interagissent entre-elles de trois manières différentes, simultanément.

venant du g ranylg ranyl) sont additives (Buser et al., 1994). Cette coopération entre ces deux sites d'ancrage est d'autant plus intense qu'aucune distance ne les sépare. La partition membranaire du g ranylg ranyl confine le segment polybasique à hauteur des lipides, et ainsi lui facilite son adsorption.

De manière intéressante, pratiquement toutes ces protéines associant un bras polybasique et une modification lipidique se localisent à la membrane plasmique dans la cellule (Hancock et al., 1990; Murray, 2002; Resh, 1996). En effet, la membrane plasmique possède, côté feuillet interne, ~60% de lipides zwitterioniques tels que PC et PE, et surtout ~25% de PS (Zachowski, 1993). Cette charge surfacique apportée par la phosphatidylsérine est appréciablement élevée par rapport à celle des autres membranes intracellulaires. Une étude montre qu'un peptide artificiel dérivé de la protéine K-Ras4B, comportant 7 lysines successives et une g ranylg ranylation, se dissocie lentement (avec un $t_{1/2}$ de l'ordre de 10 minutes) d'une membrane de composition lipidique 'physiologique', avec 30% de PS. Notons que ce même peptide sans modification lipidique s'associe aux membranes anioniques, mais avec une réversibilité extrêmement rapide ($t_{1/2}$ inférieur à la seconde).

A l'inverse d'Arf1, la protéine Rac est peu soluble avec son g ranylg ranyl. De plus, elle peut rester attachée à la membrane, qu'elle soit dans sa conformation active liée au GTP, ou inactive, liée au GDP. Cependant il existe dans la cellule, une protéine qui prévient la liaison membranaire de la protéine Rac. Cette protéine qui solubilise Rac1 est partagée par beaucoup de petites G de la famille Rho, il s'agit de la protéine RhoGDI (ou GDI). Notons la forte affinité de GDI pour ces petites protéines G ($K_d \sim 1,6-30$ nM).

c) Le cycle membrane/cytosol particulier de Rac1

Dans la structure du complexe Cdc42/GDI, Cdc42 (une protéine très comparable à Rac1 puisqu'elles partagent 71% d'identité) est g ranylg ranyl e et est carboxyméthylée (figure 21) (Hoffman et al., 2000). Au bout du bras polybasique de Cdc42, son g ranylg ranyl plonge dans une gorge hydrophobe en C-terminal de GDI : Une structure en sandwich de feuillets β à la manière d'un domaine immunoglobuline. Ce domaine responsable de la liaison au g ranylg ranyl est relié à un bras 'régulateur' aminoterminal flexible qui est en contact avec les régions switches de Cdc42. La fonction de ce bras est d'inhiber la dissociation du GDP de Cdc42, mais également d'inhiber l'hydrolyse du GTP dans le cas où GDI forme un complexe avec Cdc42 activée. Notons que l'existence d'un complexe entre GDI et une petite protéine G liée au GTP est controversée (Dransart et al., 2005; Nomanbhoy et al., 1999; Robbe et al.,

2003; Sasaki et al., 1993). Quoiqu'il en soit, le bras régulateur masque les régions *switchs* de Cdc42 de tout effecteur potentiel. Ainsi, Cdc42 complexé à GDI est fonctionnellement 'inerte', en comparaison à son état membranaire.

La structure de Cdc42-GDP en complexe avec GDI est remarquablement similaire à celle de RhoA-GDP en solution, indiquant que le GDI n'apporte aucun changement structural sur la protéine G. Inversement, il existe une réorganisation de la protéine GDI lorsqu'elle n'est pas liée à la protéine G : Premièrement, deux feuillets β de sa poche hydrophobe se réorientent, par une translation de 2,5 Å, de manière à refermer l'entrée de la cavité (Dransart et al., 2005). Deuxièmement, la structuration de son bras régulateur N-terminal est en équilibre : entre un état replié en hélice amphipathique et une forme non structurée (Lian et al., 2000). La flexibilité de ce bras régulateur (résidus 34 à 57) semble extrêmement importante pour la fonction de la protéine GDI puisque non seulement il interagit avec les régions *switchs* de la protéine G, mais également contribue hautement à l'énergie de liaison du complexe. D'ailleurs, la double mutation L55S/L56S diminue l'affinité de GDI pour la forme non prénylée de Rac1 de trois ordres de grandeur (Golovanov et al., 2001). Notons que l'absence du géranylgeranyl de Rac1 fait déjà chuter son affinité pour GDI de trois ordres de grandeur.

D'autre part, la structure du complexe suggère que des interactions d'ordre électrostatique existent entre le bras polybasique C-terminal de Cdc42 et l'extrémité N-terminale anionique et non repliée de GDI. Comme si cette protéine avait la capacité de mimer parfaitement la membrane, en lui 'recopiant' ses propriétés énergétiques : hydrophobe avec sa poche C-terminale qui prend en charge le géranylgeranyl, et électrostatique avec son extrémité N-terminale qui capte le bras polybasique de Rac1. De ce fait, la protéine GDI posséderait trois 'outils' pour extraire Rac1 de la membrane plasmique : Une région régulatrice flexible, une extrémité N-terminale anionique et une poche hydrophobe. Des cinétiques d'extraction membranaire de Cdc42 par GDI ont montré qu'il existe deux phases dans ce phénomène. Ces études ont conduit à établir un modèle séquentiel d'interaction entre GDI et Cdc42 : Dans une première phase rapide (de l'ordre de la seconde), GDI se lierait sur Cdc42 membranaire ; ensuite le complexe formé subirait une isomérisation lente (de l'ordre de la minute) où le géranylgeranyl basculerait du milieu membranaire à la poche hydrophobe de GDI (Nomanbhoy et al., 1999).

En résumé, lors de l'extraction, la longue partie N-terminale de GDI non structurée en solution se replierait en hélice au niveau des *switchs* de la petite G et se lierait de manière électrostatique à son bras polybasique en faisant compétition avec les têtes polaires

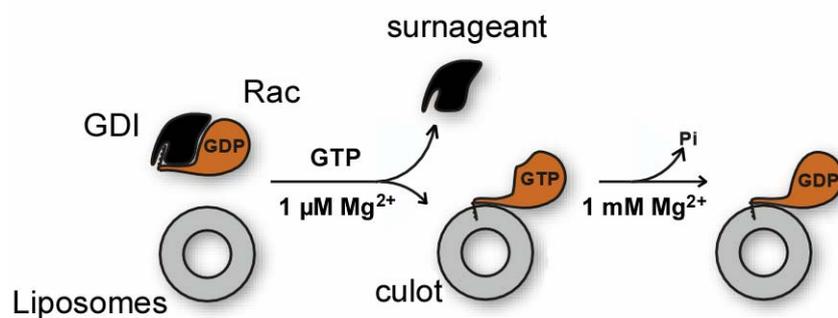


Figure 22 : Le '*GDI removal protocol*' (Robbe et al., 2003). Le protocole pour dissocier le complexe Rac1/GDI afin d'obtenir Rac1-GDP membranaire est réalisé en deux étapes. D'abord, le complexe Rac1/GDI est incubé avec des liposomes, du GTP et de l'EDTA, afin de favoriser la liaison de GTP et la translocation de Rac sur la membrane par perte d'affinité pour GDI. Les liposomes sont ensuite collectés par ultracentrifugation, tandis que GDI reste dans le surnageant. Le culot est finalement resuspendu dans un tampon contenant du magnésium, permettant ainsi l'hydrolyse intrinsèque du GTP de Rac. Ce protocole est détaillé dans l'article annexe 2.

anioniques des lipides. Ceci pourrait dans un premier temps déstabiliser la protéine de la membrane et orienter le domaine C-terminal de GDI à hauteur du géranylgeranyl, pour enfin autoriser sa bascule de la membrane vers la poche hydrophobe de GDI. On comprend donc pourquoi GDI possède une si forte affinité pour Rac1 et également pourquoi la composition lipidique de la membrane doit être adéquate pour accueillir Rac1 lors de sa translocation.

Nous avons déterminé biochimiquement quelles sont les conditions membranaires optimales pour permettre la dissociation du complexe Rac1/GDI, c'est-à-dire les conditions qui accommodent au mieux Rac1 sur une bicouche lipidique. Pour cela, nous disposons au laboratoire d'une technique intéressante : le '*GDI removal protocol*' (Robbe et al., 2003). Cette technique est basée sur l'affinité réduite de GDI pour Rac1 lié au GTP par rapport à sa forme liée au GDP (Sasaki et al., 1993). Elle consiste à dissocier les protéines du complexe Rac1-GDP/GDI purifié, grâce à l'échange 'artificiel' du GDP en Rac1 en GTP en présence de vésicules d'azolectine. La liaison du GTP à Rac1 déplace ainsi l'équilibre vers sa forme membranaire, débarrassée de GDI. Les vésicules sont ensuite collectées par ultracentrifugation, puis reprises avec un tampon physiologique permettant l'hydrolyse intrinsèque du GTP en GDP par Rac1 membranaire (figure 22).

Ces vésicules d'azolectine sont couramment utilisées pour établir rapidement l'existence d'une interaction protéine/membrane. Toutefois la composition lipidique de l'azolectine reste à ce jour très mystérieuse et varie selon les sources : Il y aurait dans l'azolectine ~25% PC, ~25% PE, ~25% PI, du PS, du PA, certainement des phosphoinositides tel que du PIP₂, des lysophospholipides et des stérols... C'est pourquoi, afin de définir les meilleures conditions membranaires pour dissocier le complexe Rac1/GDI, nous avons utilisé différents types de liposomes de composition lipidique déterminée.

La composition des liposomes utilisés est établie sur une base de lipides neutre : PC (30-60%), PE (20%) et cholestérol (20%), avec un taux variable en lipides anioniques, que l'on ajoute aux dépens du PC. L'augmentation du pourcentage de lipide anionique PS dans des membranes accroît la proportion de Rac1 lié aux liposomes. La liaison totale de Rac1 est pratiquement atteinte avec un taux de PS de 30% (figure 2 de l'article annexe 2). Cette expérience est en accord avec celle mentionnée plus haut sur le peptide K-Ras4B (Leventis and Silviu, 1998). De plus, si en présence de membranes neutres, Rac1 reste majoritairement en complexe soluble avec GDI, Rac1 se lie fortement et de manière identique sur d'autres types de liposomes comportant des lipides anioniques tels que PG et PA à hauteur de 30%. Ceci suggère que, durant l'échange GDP/GTP, des interactions électrostatiques non

spécifiques entre Rac1 et les lipides de la membrane contribuent à la bascule de son géranylgeranyl entre la poche hydrophobe de GDI et la bicouche lipidique.

En résumé, d'après la structure et les données établies ci-dessus, il semble que le bras polybasique de Rac1 interagit de manière électrostatique avec d'une part GDI lorsqu'il est en complexe soluble, et d'autre part avec les phospholipides anioniques lorsqu'il est lié à la membrane. Tout se passe comme si une compétition existait entre la membrane et GDI pour Rac1, lors de son cycle cytosol/membrane.

En conclusion, les petites protéines G Arf1, Rac et Rab utilisent toutes un moyen très simple pour s'associer à une membrane : Elles portent une modification lipidique qui préfère l'hydrophobicité des membranes plutôt que le milieu aqueux du cytosol. Cependant, la chimie comme le nombre de ces modifications lipidiques diffèrent selon les petites protéines G, ceci leur apportant une contribution énergétique variable. Cette énergie hydrophobe est parfois insuffisante pour fixer stablement ces protéines à la membrane, c'est pourquoi les protéines G Arf1 et Rac utilisent un moyen d'ancrage supplémentaire. Arf1 combine son myristate à une hélice amphipathique et Rac1 son géranylgeranyl à une région polybasique qui interagit par liaison électrostatique avec les têtes polaires anioniques des lipides. En revanche, des protéines Rab portent une double géranylgeranylation en C-terminal, un ancrage membranaire tellement puissant à lui seul qu'il est irréversible (les $t_{1/2}$ de dissociation se comptent en jours).

Ces petites protéines G qui s'associent aux membranes, doivent également s'en dissocier et ainsi recommencer un cycle fonctionnel. Arf1 bascule d'un état membranaire à un état cytosolique par un changement de conformation intrinsèque astucieux, en revanche, Rac1 nécessite un partenaire protéique, GDI, pour sa solubilisation. Contrairement à Arf et Rac, les protéines Rab ne nécessitent pas d'ancrage supplémentaire pour se fixer fortement à la membrane ; mais comme Rac, Rab possède des partenaires permettant son extraction et son recyclage membranaire : Ces protéines sont REP et RabGDI, elles reconnaissent spécifiquement une partie d'une longue région C-terminale non structurée de Rab, la région 'hypervariable', et interagissent avec la double modification géranylgeranyl (Wu et al., 2007). Les petites protéines G utilisent donc un jeu subtil de balance énergétique, faisant intervenir leurs propriétés d'interactions multiples, pour passer alternativement d'un état cytosolique à un état membranaire.

3) Etude d'un nouveau domaine de liaison aux membranes

La translocation membranaire d'une petite protéine G suite à son activation, repose sur la localisation membranaire de son facteur d'échange (GEF). En effet, l'interaction des facteurs d'échanges ARNO et Tiam avec la membrane, par leur domaine PH, augmente remarquablement leur activité d'échange sur les petites protéines G Arf1 et Rac1 respectivement (Chardin et al., 1996; Robbe et al., 2003). Pourtant, ces petites protéines G sont plutôt cytosoliques lorsqu'elles sont inactives. Leur conformation structurale leur permet effectivement d'être solubles dans le cas d'Arf1-GDP, ou de s'associer avec un partenaire cytosolique, GDI, dans le cas de Rac-GDP. L'explication de cet avantage catalytique pourrait provenir de la réduction de dimensionnalité qu'offre la surface d'une membrane par rapport à un grand volume de liquide. Par exemple, l'interaction membranaire, même modeste d'Arf1-GDP, accroît sa probabilité de rencontre avec son facteur d'échange, par augmentation de leur concentration locale d'une part, mais aussi par des effets subtils d'orientation des protéines sur la membrane. Ainsi, les membranes lipidiques sont nécessaires pour garantir une réaction d'échange efficace, puisque protéines G et facteurs d'échange possèdent les outils moléculaires leur permettant de s'y lier. Notons que d'une manière générale, de nombreux effecteurs, facteurs d'échange ou protéines GAP, possèdent un moyen de se lier aux membranes, afin d'optimiser leur interaction avec les petites protéines G.

Lors de mon DEA et le début de ma thèse, j'ai étudié l'inactivation de la protéine Rac par la Toxine Létale (*Lethal Toxin* ; LT) de la bactérie *Clostridium sordellii*. L'objectif de ce travail était de vérifier si la LT profite aussi de la membrane pour interagir avec la petite protéine G Rac, comme le font nombre de ses partenaires cellulaires.

La LT appartient à la famille des grandes toxines clostridiales, connues pour leur taille exceptionnelle, allant jusqu'à 300 kDa. On retrouve parmi elles, les Toxines A et B de *C. difficile*, et l' α -toxine de *C. novyi* (Busch and Aktories, 2000). De façon intéressante, toutes ces toxines possèdent des séquences hautement similaires ; le pourcentage d'identité de séquence entre la LT et la Toxine B est de 76%. Ces toxines ont la propriété d'inactiver certaines petites protéines G de la famille Rho et de la famille Ras par glycosylation. En effet, le domaine catalytique de ces toxines, centré sur un motif DXD conservé, agit comme une glycosyltransférase : Il interagit d'abord avec une molécule d'UDP-glucose qu'il coordonne avec un atome de manganèse (Mn^{2+}), puis catalyse le transfert du groupe glucosyl de cette

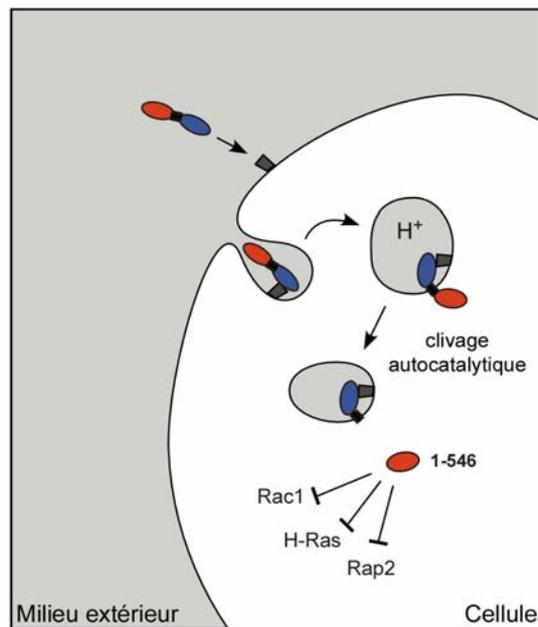
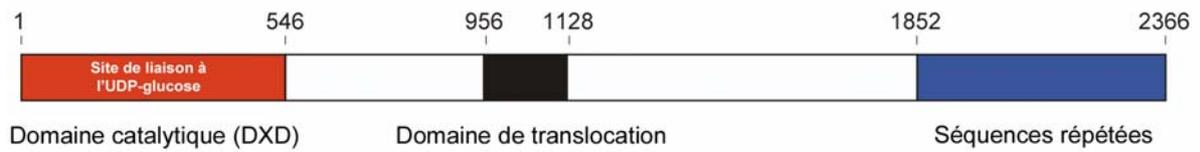


Figure 23 : Structure modulaire de la Toxine Létale (LT) de *Clostridium sordellii*, et transport de la LT vers le cytoplasme.

molécule sur un résidu conservé de la petite protéine G (Busch et al., 1998). Ce résidu, la thréonine 35 chez Rac, est important dans la coordination du nucléotide à guanine. Notons que la thréonine 35, située sur la région switch II de Rac, est plus accessible à la toxine lorsque la protéine est liée au GDP. La glycosylation affecte modérément l'échange nucléotidique et l'hydrolyse du GTP intrinsèque de Rac, mais inhibe en revanche toute interaction de Rac avec son partenaire GDI, et des effecteurs (Sehr et al., 1998).

Les toxines clostridiales, relarguées par les bactéries dans le milieu extracellulaire, utilisent un mécanisme original pour pénétrer dans les cellules. Ces toxines sont composées de trois domaines distincts, qui interviennent de façon séquentielle au cours de l'infection (figure 23) (Pfeifer et al., 2003) : Le domaine C-terminal, composé de séquences répétées structurées en β -solénoïdes, est responsable de la liaison sur la membrane de la cellule hôte, vraisemblablement en interagissant avec des carbohydrates exposés à la surface des cellules (Greco et al., 2006; Ho et al., 2005). La toxine est alors endocytosée. La diminution de pH dans les endosomes précoces permettrait à une région hydrophobe médiane de se démasquer et d'interagir avec la membrane. De façon intéressante, les Toxines A et B sont connues pour faire des pores dans des membranes à faible pH (Giesemann et al., 2006). Un modèle propose que la formation du pore projetterait le domaine N-terminal de la toxine depuis le côté luménal vers le côté cytosolique de l'endosome. Ensuite, par un processus autocatalytique dépendant d'un cofacteur cellulaire cytosolique (les inositolphosphates, et en particulier l'InsP(6)), le domaine N-terminal est clivé du reste de la toxine, et est libéré dans le cytosol de la cellule (Reineke et al., 2007). Ce domaine, qui porte l'activité cytotoxique, glycosyle les petites protéines G, ce qui conduit inéluctablement à la mort cellulaire.

Nous avons abordé un aspect mal connu de la glycosylation des petites protéines G par la Toxine Létale de *C. sordellii* : l'influence de l'environnement lipidique dans cette réaction. La plupart des études réalisées sur l'activité de ces toxines utilisent des petites protéines G recombinantes solubles comme substrat. Cependant, ces protéines, nous l'avons vu, possèdent une modification lipidique, un géranylgeranyl dans le cas de Rac, qui leur permet de se lier aux membranes lipidiques. De façon intéressante, des études indiquent que les petites protéines G de la famille Rho ne sont pas attaquables par la Toxine B de *C. difficile*, lorsqu'elles sont en complexe avec GDI (Genth et al., 1999). Ceci suggère que seul Rac membranaire est un substrat glycosylable par la LT.

Nous avons d'abord étudié les propriétés de liaison de la Toxine Létale sur des liposomes de composition lipidique définie. Ces expériences ont révélé que le domaine N-

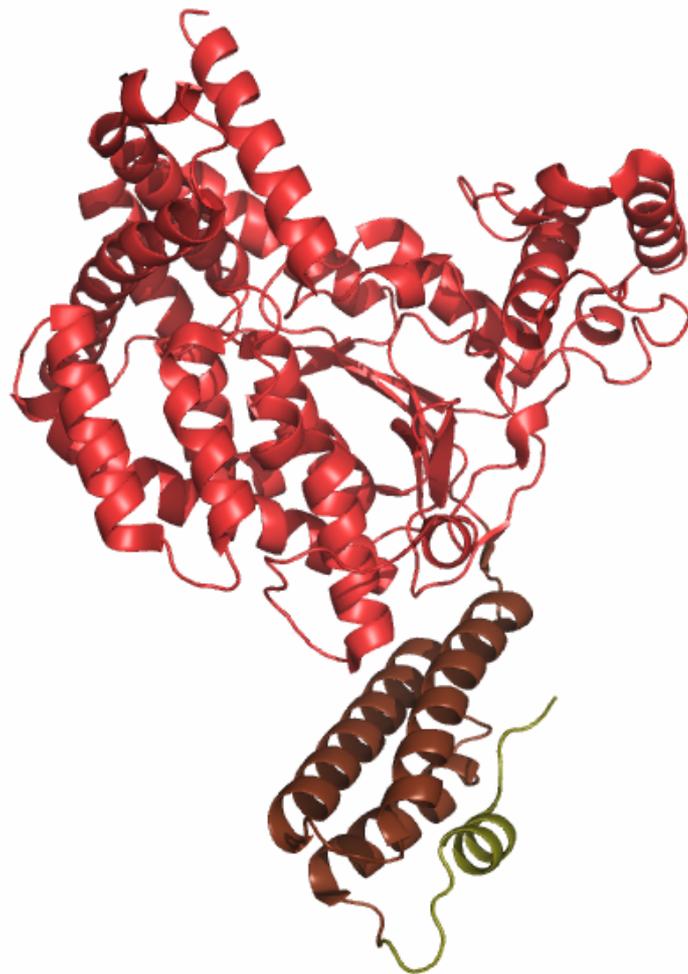


Figure 24 : Structure du domaine catalytique (1-546) de la Toxine B de *Clostridium difficile* (Reinert et al., 2005). Les 18 premiers acides aminés (colorés en vert) appartiennent à un sous domaine N-terminal (en marron) de 93 résidus, composé de quatre hélices α assemblées en fagot.

terminal de cette toxine se lie préférentiellement sur des membranes riches en phosphatidylsérine, plutôt qu'un autre lipide anionique. D'autre part, la liaison de la toxine sur la phosphatidylsérine augmente de deux ordres de grandeur sa vitesse de glycosylation sur Rac membranaire. Des études de protéolyse ménagée et de délétion, nous ont permis de démontrer l'existence d'un site de liaison spécifique à la phosphatidylsérine, qui comprend les 18 premiers résidus de la LT. Nous montrons par ailleurs que la délétion de ces 18 résidus supprime totalement la cytotoxicité de la LT (Mesmin et al., 2004). L'article associé à cette étude est annexé à cette thèse (article annexe 1).

Cette étude montre que le domaine cytosolique de la Toxine Létale tire un avantage de l'environnement lipidique pour modifier Rac. La spécificité à l'égard du PS est intéressante dans le sens où nombre de ses substrats glycosylables (Rac, Ras...) sont prénylés et dirigent leur action à partir du feuillet interne de la membrane plasmique, connu pour son abondance en PS. De ce fait, la LT est particulièrement bien adaptée pour 'traquer' ses cibles intracellulaires. La courte séquence de 18 acides aminés en N-terminal de la LT, essentielle pour sa liaison au PS, porte 4 résidus basiques et 9 résidus hydrophobes, de plus aucun résidu n'est acide. La chimie de cette séquence concorde donc avec un lipide chargé négativement comme la phosphatidylsérine. Toutefois, nos expériences n'ont pas démontré si cette extrémité N-terminale, nécessaire à la liaison membranaire de la toxine, est également suffisante à cette liaison.

Un an après notre étude, le groupe de Aktories publie la structure cristallographique du domaine N-terminal 1-546 de la Toxine B de *C. difficile* (figure 24) (Reinert et al., 2005). Cette structure montre que plusieurs domaines en hélices α entourent le cœur catalytique de la toxine, similaire à celui de nombreuses glycosyltransférases de type A (GT-A). La structure de cette toxine est intéressante, car la Toxine B présente 76% d'identité, et 90% de similitude de séquence avec la LT. De ce fait, nous pouvons réaliser le modèle de la structure de la LT par homologie à partir de celle de la Toxine B, avec un niveau de confiance important. De façon remarquable, les 18 premiers résidus de la toxine appartiennent à un sous domaine détaché du reste de la molécule. Ce lobe N-terminal comporte 93 résidus, et est formé par quatre petites hélices α organisées en fagot. Au sommet de ce fagot, les jonctions entre les hélices forment une sorte de 'plate-forme' flexible, portant des résidus hydrophobes et basiques pour la LT. Cette plate-forme pourrait être le site de spécificité à la phosphatidylsérine, et le fagot de 4 hélices, le domaine nécessaire et suffisant pour la liaison de la toxine. Les calculs de potentiel électrostatique à partir du modèle de la structure de la LT

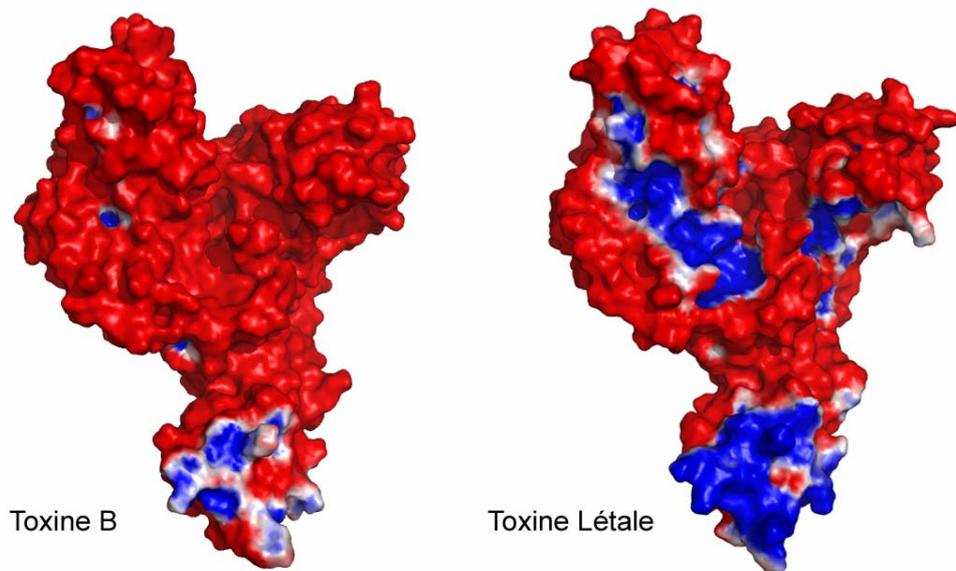


Figure 25 : Surfaces moléculaires des domaines catalytiques (1-546) de la Toxine B et de la LT (structure par homologie), colorés selon leur potentiel électrostatique. Le lobe N-terminal de 93 résidus de la LT a un caractère beaucoup plus basique que celui de la Toxine B.

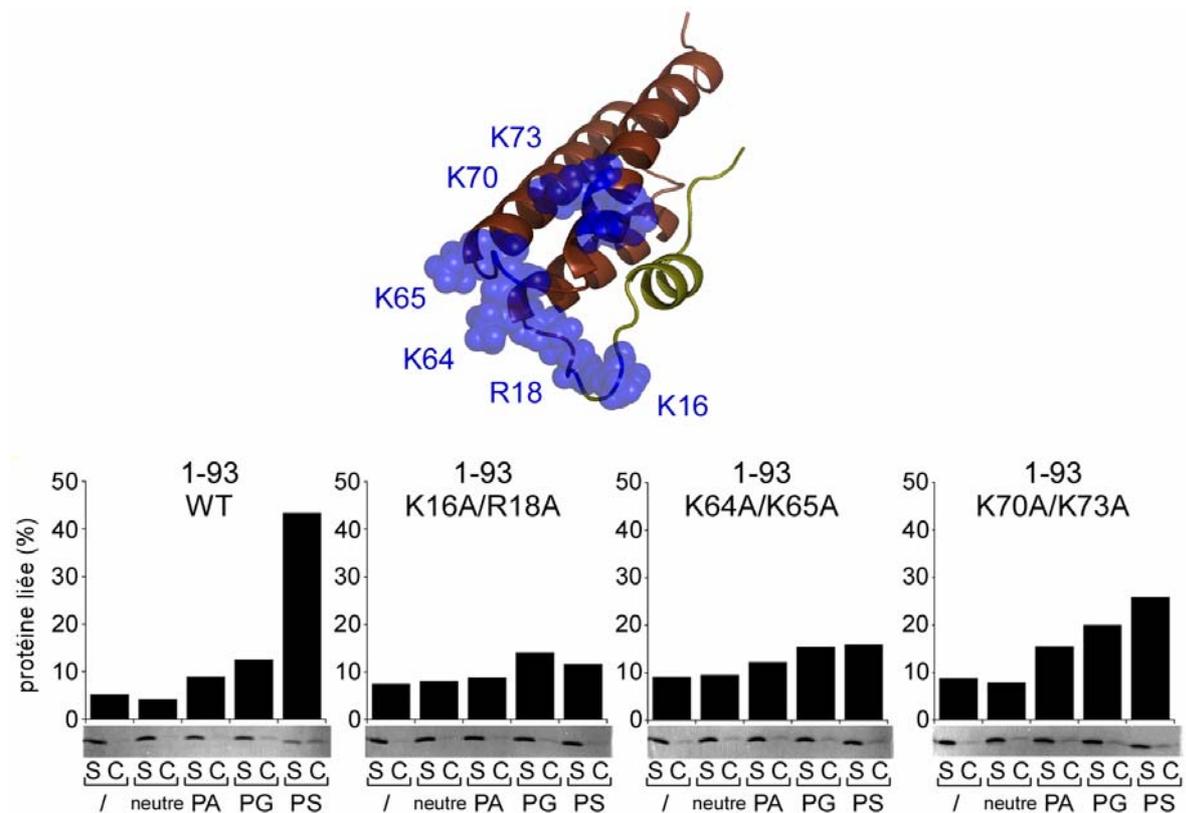


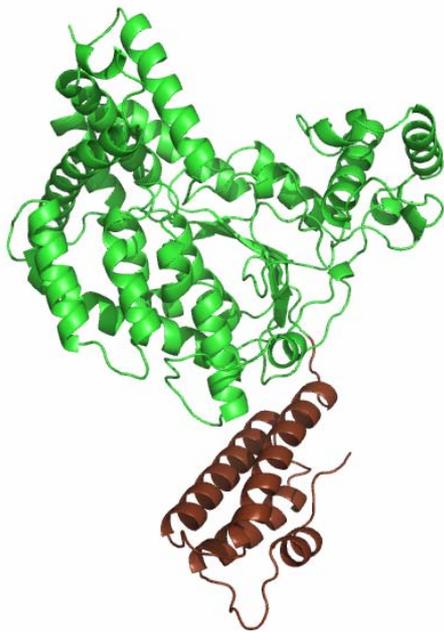
Figure 26 : Expériences de liaison du fragment 1-93 de la toxine LT, et de divers mutants, sur des liposomes par sédimentation. Les liposomes contiennent 30 à 60% de PC, 20% de PE, 20% de cholestérol, et sont enrichis ou non par les lipides anioniques indiqués (30%). S : surnageant ; C : culot.

1-546 indiquent que ce lobe N-terminal est très basique, ce qui paraît normal compte tenu des nombreux résidus lysine et arginine présents à cet endroit (figure 25). En revanche, le caractère basique de ce même domaine chez la Toxine B paraît moins marqué.

Nous avons réalisé des expériences de liaison du domaine 1-93 sur liposomes. Ces expériences montrent qu'il se lie sur des liposomes contenant du PS, mais non sur des liposomes enrichis par un autre lipide anionique (figure 26). Notons toutefois que cette liaison est un peu plus faible que celle observée avec domaine N-terminal entier (1-546) (Mesmin et al., 2004). Il est probable que le site de liaison membranaire dans le contexte du domaine entier, puisse profiter du pouvoir électrostatique du reste de la molécule, sachant que la force d'attraction de Coulomb s'applique sur de longues distances. Nous avons effectué différentes mutations touchant des résidus basiques au sommet du lobe 1-93, afin de mesurer leurs effets sur sa liaison membranaire. Notons que ces mutations par paires (K16A/K18A ; K64A/K65A ; K70A/K73A) incluent des résidus en dehors de la courte séquence 1-18. Les résultats obtenus indiquent que les mutants K16A/K18A et K64A/K65A ne se lient plus aux membranes, quelle que soit leur composition. Les effets du mutant K70A/K73A sont plus modestes. Donc, plusieurs résidus, appartenant ou non aux 18 premiers résidus de la toxine, semblent impliqués dans sa liaison membranaire. Le fagot de 4 hélices serait donc le domaine nécessaire et suffisant pour la liaison spécifique de la toxine à la phosphatidylsérine. Toutefois, nous n'expliquons pas pourquoi ce lipide, plutôt qu'un autre, est spécifiquement reconnu. Il est probable que cette reconnaissance repose sur le caractère flexible de la plateforme au sommet du lobe 1-93. Les deux boucles reliant les hélices 1 et 2 et les hélices 3 et 4, pourraient s'adsorber profondément dans la membrane, grâce à leur richesse en résidus positivement chargés et en résidus hydrophobes. En effet, nous avons montré qu'une forte compaction des lipides de la membrane (obtenue par l'introduction de DP-lipides) défavorise la liaison et l'activité de la toxine (figure 3 de l'article annexe 1). Des résidus hydrophobes doivent donc s'insérer entre les têtes polaires des lipides pour assurer la liaison membranaire de la toxine. La combinaison d'interactions électrostatiques et hydrophobes rapprocherait le site de reconnaissance de la région des têtes polaires des lipides, lui permettant de distinguer une tête polaire de phosphatidylsérine, d'une autre tête polaire. La caractérisation structurale du domaine 1-93 de la toxine LT, en présence de phosphosérine par exemple, pourrait être utile pour déterminer plus précisément le mécanisme moléculaire de cette association.

Récemment, la structure cristallographique de la région C-terminale de la toxine PMT de la bactérie *Pasteurella multocida* a été établie (Kitadokoro et al., 2007). De façon

Domaine N-terminal de la
Toxine Létale (modélisation)



Domaine C-terminal de la
toxine PMT (*Pasteurella multocida*)



Figure 27 : Un domaine de liaison membranaire similaire à celui de la Toxine Létale existe dans une autre toxine bactérienne.

surprenante, cette toxine, très éloignée des grandes toxines clostridiales, possède une région 'C1' dont la structure et la séquence sont similaires à celle du lobe 1-93 de la Toxine B (figure 27). De plus, les auteurs montrent que cette région, comme la région 1-93 de la Toxine Léthale, s'associe aux membranes lipidiques. En effet, des études cellulaires indiquent que la région C1 est nécessaire et suffisante pour permettre la localisation de la toxine à la membrane plasmique. Comme la Toxine Létale, la PMT dirige son action sur des substrats localisés sur la membrane plasmique, et possède donc une structure bien adaptée à sa fonction.

En conclusion, le domaine formé de quatre petites hélices structurées en fagot, qui porte le site de liaison spécifique à la phosphatidylsérine dans la LT, semble être un domaine de liaison membranaire général, utilisé par des toxines bactériennes agissant sur des cibles cellulaires localisées sur la membrane plasmique.

CHAPITRE III :

LE TRANSPORT VESICULAIRE COPI
ET L'APPAREIL DE GOLGI

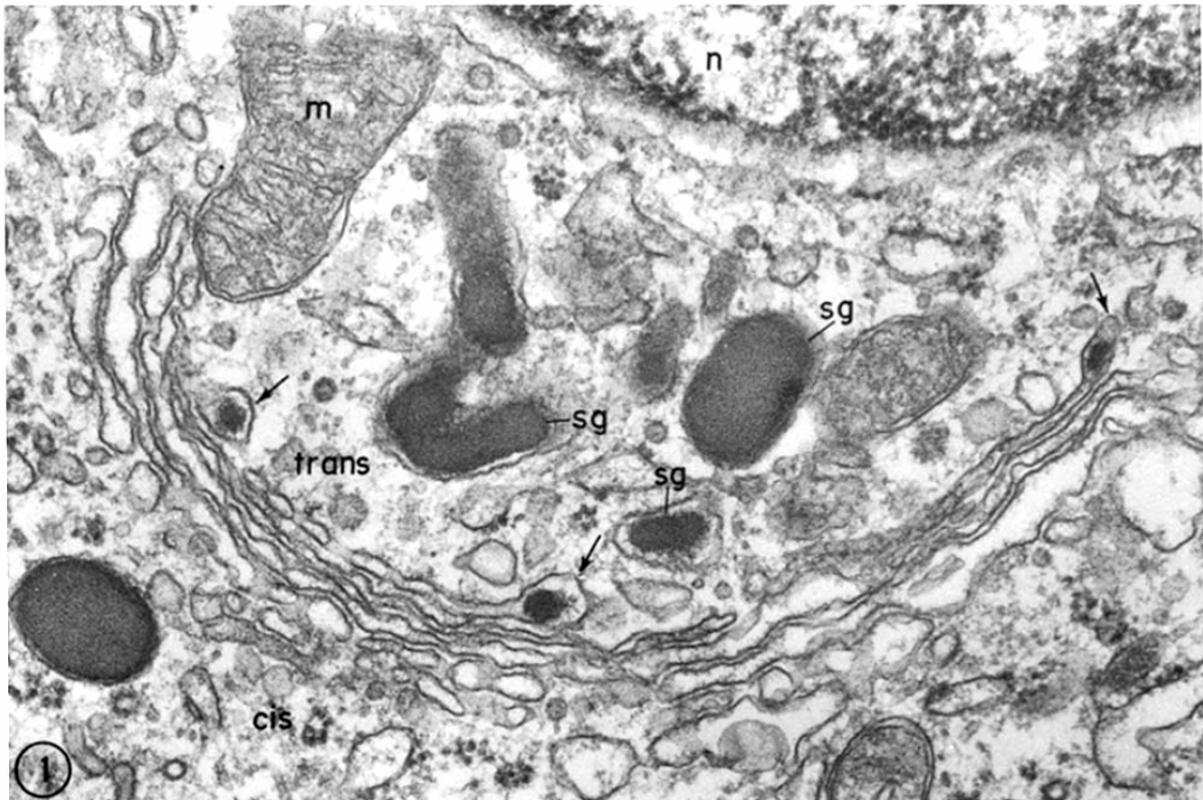


Figure 28 : Cliché de microscopie électronique ($\times 67000$). Région golgienne d'une cellule sécrétrice de glande pituitaire de rat. Un empilement de trois à cinq saccules golgiens est observé. Des granules de sécrétion (sg) contenant de la prolactine résultent de la fusion de vésicules émergeant de la face *trans* du Golgi (flèches). n : noyau ; m : mitochondrie. (D'après Farquhar et Palade, 1981).

Le Transport vésiculaire COPI et l'Appareil de Golgi

1) La naissance du Golgi

En 1869, Camillo Golgi commence sa carrière scientifique à Pavie en Italie, où il étudie la structure et la fonction du système nerveux. A l'époque, les techniques histologiques basées sur de la coloration au carmin ou à l'hématoxyline, permettent de visualiser l'organisation cellulaire, mais Golgi les trouve inadaptées aux cellules nerveuses. Trois ans plus tard, alors qu'il est contraint de travailler dans sa propre cuisine faute de moyens, Golgi met au point un procédé de coloration révolutionnaire avec du nitrate d'argent et du bichromate de potassium, appelée la 'réaction noire'. Grâce à cette teinture, il découvre en 1898 un système réticulaire interne, qui sera baptisé plus tard « Appareil de Golgi ». Toutefois, la découverte de Golgi fait l'objet de controverses pendant de longues années, car sa méthode de coloration est parfois hasardeuse et colore d'autres structures cellulaires, ainsi que des neurones entiers. Le doute sur un éventuel artéfact de coloration n'a été levé que 50 ans plus tard, avec l'avènement de la microscopie électronique. Plusieurs publications en 1954, dont celle de Dalton et Felix, finissent par convaincre les plus sceptiques sur la réalité de l'Appareil de Golgi (Farquhar and Palade, 1981; Farquhar and Palade, 1998).

Toutes les études menées sur l'Appareil de Golgi en microscopie électronique dans les années 50 le définissent comme un ensemble de sous-compartiments distincts, comprenant un empilement de saccules parallèles bordé de part et d'autre par un réseau tubulo-vésiculaire. L'association étroite de granules de sécrétion et d'éléments du Golgi est également constatée (figure 28). De plus, ces études montrent que le Golgi est présent dans toutes les cellules eucaryotes et apparaît même surdéveloppé dans certaines cellules sécrétrices. Ces observations s'accompagnent d'abondantes spéculations sur sa fonction, notamment dans la sécrétion, mais il faut attendre encore une quinzaine d'années pour que soit attribué un véritable rôle au Golgi. Des études évoquent alors des taux élevés dans le Golgi en glucose, en galactose et en sulfates par rapport au reste de la cellule, mais aussi une forte concentration en enzymes particulières, comme la galactosyltransférase, révélant la responsabilité du Golgi dans les modifications de protéines néosynthétisées (Morre et al., 1969; Whur et al., 1969). Parallèlement, les techniques de marquage liées à la microscopie électronique fleurissent (cytochimie, autoradiographie, etc.), et permettent de voir que la répartition de certaines

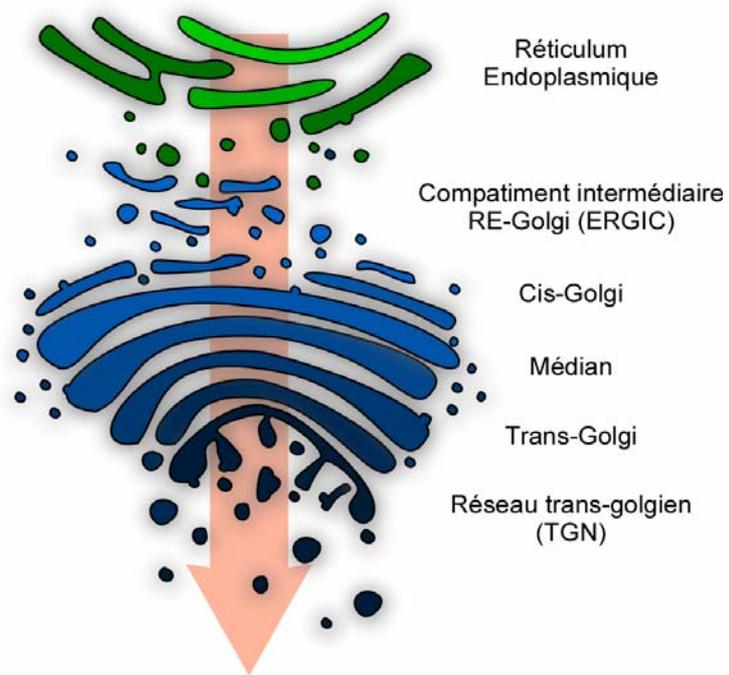


Figure 29 : Structure du complexe golgien. ERGIC: *Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment*. TGN: *Trans Golgi Network*.

enzymes n'est pas homogène le long du complexe golgien, mais plutôt localisée sur un seul pôle (Novikoff and Goldfischer, 1961). Ces études établissent pour la première fois l'existence de sous-compartiments 'cytochimiques' calqués sur la morphologie du Golgi, bien que leurs frontières ne soient pas clairement distinctes. On reconnaît aujourd'hui quatre compartiments : le *cis* (aussi appelé CGN), le *medial*, le *trans* et le réseau *trans*-golgien (TGN : *trans*-Golgi network) (figure 29). Chacun d'entre eux possède des enzymes particulières, qui sont en quelque sorte les 'marqueurs' de ces compartiments.

Les années 60 et 70 sont également marquées par la description de la voie de transport intracellulaire des protéines de sécrétion et le rôle central du Golgi dans ce processus. En effet, grâce à des expériences de 'pulse-chase', Palade propose le modèle d'un trafic vectoriel de protéines de sécrétion à travers la cellule : Initialement synthétisées dans le Réticulum endoplasmique, les protéines sont d'abord emmenées par de petites vésicules dans le *cis*-Golgi. Ensuite, les protéines sont transportées et empaquetées dans les parties dilatées du *trans*-Golgi (Palade, 1975). Durant leur transit golgien, en plus d'être concentrées, les protéines reçoivent des modifications post-traductionnelles : glycosylation, sulfatation, et subissent parfois une protéolyse. A partir du Golgi, les protéines sont triées et empaquetées dans des vésicules qui s'engagent dans le cytoplasme pour gagner soit d'autres organelles intracellulaires, comme les lysosomes, soit la membrane plasmique pour y décharger leur contenu sécrétoire par exocytose.

Si d'intenses explorations ont déjà été menées sur la voie de sécrétion intracellulaire vers la fin des années 70, les événements moléculaires associés au transport des protéines à travers la cellule sont encore obscurs. Le groupe de Schekman travaille alors sur la génétique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, et identifie une vingtaine de mutants conditionnels thermosensibles touchés dans la sécrétion, mais continuant à synthétiser des protéines et des lipides (Novick et al., 1980). Ces mutants '*sec*' sont sélectionnés par leur densité anormalement élevée à température restrictive. En effet, ces levures observées en microscopie électronique accumulent des organelles sécrétoires internes sans que leur taille n'augmente. Schekman et Novick classent les mutants selon le type d'organelle accumulé, c'est-à-dire selon l'étape du transport qui est inhibée. L'utilisation de doubles mutants *sec* a permis dans un second temps d'établir la séquence des événements impliqués lors de la sécrétion (Novick et al., 1981). Ainsi, 9 produits de gènes sont requis pour le passage des protéines de sécrétion du RE au Golgi, 2 permettent leur empaquetage dans des vésicules à la sortie du Golgi, et 10 autres produits de gènes sont responsables du transport de ses vésicules jusqu'à la membrane plasmique et de leur fusion. Tous ces processus nécessitent de l'énergie. Les travaux de

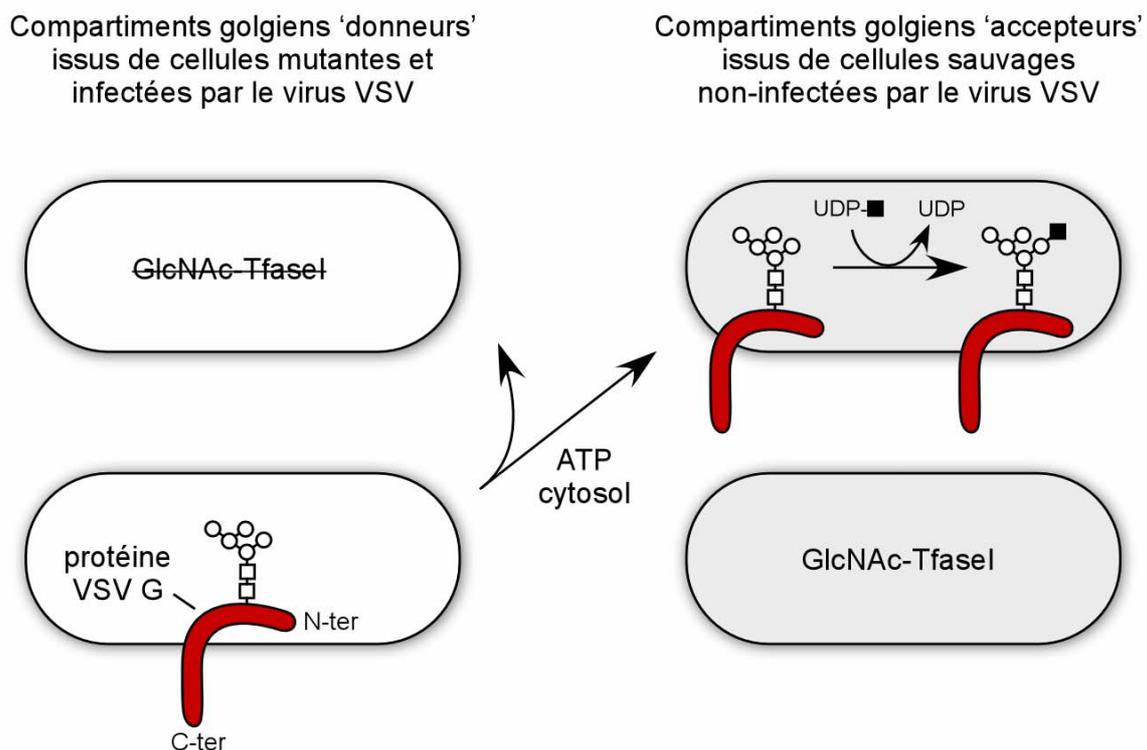


Figure 30 : Test de transport de protéines entre différents compartiments golgiens (Balch et al., 1984). Une fraction membranaire golgienne donneuse est préparée à partir de cellules mutantes pour la N-AcetylGucosamine Transférase I (GlcNAc-TfaseI), infectées avec le virus VSV. Cette fraction est incubée avec une fraction golgienne provenant de cellules sauvages et non infectées. L'incorporation de H^3 -GlcNAc (■) depuis l'UDP-GlcNAc dans la protéine VSV-G se produit si la protéine est transférée d'un compartiment à l'autre de manière dissociative.

généétique de l'équipe de Schekman donnent pour la première fois une dimension moléculaire à l'organisation spatio-temporelle de la voie de sécrétion.

2) Un transport vésiculaire dévoilé dans le Golgi

Au début des années 80, il est clair qu'un trafic intense existe au sein du Golgi, venant de différentes directions, incluant la synthèse de membrane, son recyclage, et le transport de protéines de sécrétion. Cependant, le mode de transport emprunté par les produits de sécrétion depuis le *cis*-Golgi jusqu'au *trans*-Golgi est controversé. Deux théories sont proposées : La première, introduite trente ans plus tôt par des morphologistes, suggère que le Golgi est une structure en évolution permanente, avec une formation continue de saccules *cis* évoluant progressivement en saccules *trans*, puis en granules de sécrétions (Beams and Kessel, 1968). Dans ce modèle, les saccules emmènent avec eux les molécules qu'ils contiennent dans le sens antérograde, garantissant ainsi leur transport. Cependant, ce modèle ne pouvait expliquer le gradient cytochimique du Golgi, observé entre sa face *cis* et sa face *trans*. En revanche, un second concept introduit en 1981 tient compte de ce gradient intragolgien : Il se base sur un transport vésiculaire antérograde entre deux saccules stationnaires. Les vésicules seraient ainsi des intermédiaires de transport acheminant les protéines d'un compartiment à un autre de compositions enzymatiques distinctes (Farquhar and Palade, 1981). Ce modèle séduisant prend un avantage considérable sur celui de la 'progression des citernes', car il est fortement appuyé par les études biochimiques de Rothman dès le milieu des années 80, qui décortique les mécanismes moléculaires du transport vésiculaire entre les saccules.

Tout commence par un test *in vitro* prometteur que le laboratoire de Rothman élabore en 1984. Ce test permet de définir les conditions biochimiques qui gouvernent le transport entre deux compartiments golgiens purifiés (figure 30). Il est basé sur l'utilisation d'un type cellulaire mutant, ne possédant pas l'enzyme golgienne N-AcetylGlucosamine Transférase I (GlcNAc-TfaseI), dont la fonction est de catalyser l'addition d'oligosaccharides sur des protéines en transit dans le Golgi. Ces cellules mutantes sont infectées par le virus VSV qui détourne la machinerie cellulaire à son profit. Durant l'infection virale, la glycoprotéine du VSV synthétisée dans le RE passe par le Golgi pour ensuite atteindre la membrane plasmique. Les compartiments golgiens provenant de ces cellules infectées sont purifiés pour le test. Le transport de la glycoprotéine du VSV entre ces compartiments 'donneurs' et d'autres

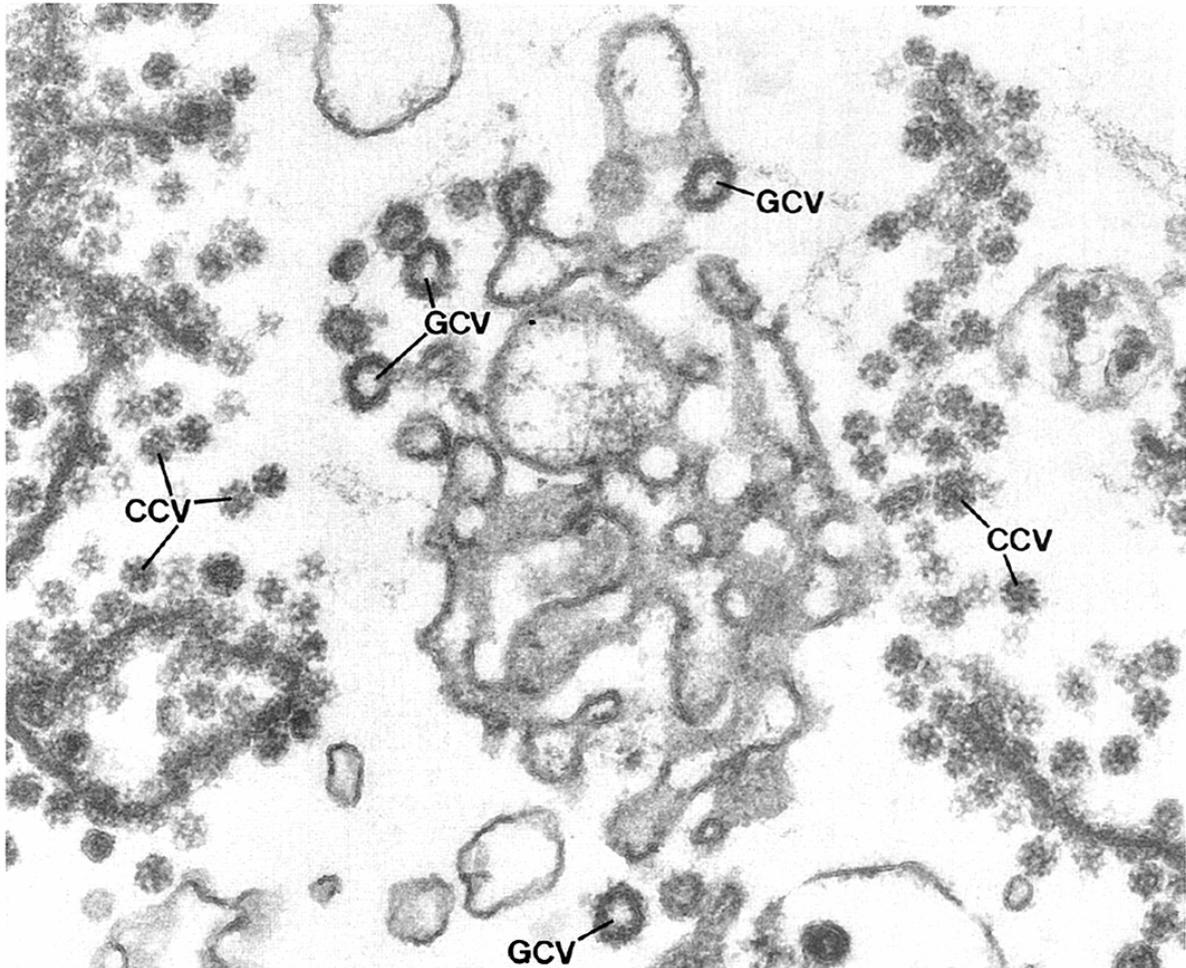


Figure 31 : Cliché de microscopie électronique ($\times 72000$). Fractions golgiennes mélangées à des vésicules recouvertes de clathrine purifiées (Orci et al., 1986). Le manteau protéique recouvrant les vésicules golgiennes (GCV) diffère clairement des structures typiques ressemblant à des cages que forment de clathrine (CCV).

compartiments 'accepteurs', purifiés à partir de cellules sauvages non infectées et possédant l'enzyme GlcNAc-TfaseI, est mesuré par l'incorporation de ^3H -GlcNAc dans la glycoprotéine (Balch et al., 1984). Ce test, qui a l'avantage d'être direct, sensible et quantitatif, établit que le transport entre compartiments n'est possible que lorsqu'ils sont incubés en présence de cytosol, d'ATP et d'un système de régénération de l'ATP. De plus, l'activité du cytosol est sensible aux protéases et dépend de la présence de magnésium. Ces premières informations fournies par le test de Rothman sont capitales, car elles prédisent que le transport inter-compartiments dans le Golgi nécessite du matériel protéique soluble.

a) La découverte d'un manteau

Deux ans après, Orci fait une observation morphologique majeure en microscopie électronique sur le Golgi (Orci et al., 1986). Il regarde des citernes isolées, incubées dans les conditions de 'transport' de Rothman (c'est-à-dire avec du cytosol et de l'ATP), et voit à la surface des membranes golgiennes la formation de bourgeons et de vésicules de ~100 nm de diamètre, coiffés d'un manteau protéique se distinguant du manteau à clathrine morphologiquement et immunologiquement (figure 31). La contenance des bourgeons en glycoprotéine du VSV suggère que le transport à travers le Golgi est dépendant de ce type de vésicules à manteau. Parallèlement à cela, toujours en utilisant son test, Rothman révèle que le transport entre les compartiments est inhibé par des agents jouant sur des protéines 'G', c'est-à-dire liant un nucléotide à guanine (Melancon et al., 1987). Ces agents sont soit les analogues non hydrolysables du GTP, comme le $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ou le GMP-PNP, soit les complexes aluminofluorés (AlF_x) mimant le γ -phosphate d'un GTP dans le site nucléotidique d'une protéine. A l'époque, ces agents sont connus pour maintenir une protéine G dans son état actif de façon permanente (Bigay et al., 1985; Gilman, 1987). D'autre part, Rothman montre que l'inhibition due au $\text{GTP}\gamma\text{S}$ touche la fonction du compartiment 'accepteur' et non celle du 'donneur', en d'autres termes les dernières étapes du transport et non le bourgeonnement de la vésicule. En fait, des observations morphologiques indiquent qu'il existe, particulièrement en présence de $\text{GTP}\gamma\text{S}$, une accumulation massive de vésicules entourées de manteau à proximité des saccules golgiennes. Ceci suggère que le $\text{GTP}\gamma\text{S}$ bloque une étape avant ou pendant le processus qui permet aux vésicules golgiennes de se débarrasser de leur manteau protéique, avant la fusion.

Sans pour l'instant comprendre l'effet du $\text{GTP}\gamma\text{S}$ observé aussi bien en microscopie que dans le test de transport, Rothman et Wieland caractérisent biochimiquement le nouveau

manteau protéique du Golgi (Serafini et al., 1991b). Le manteau décrit se compose de quatre 'grandes' protéines : α -COP (160 kDa), β -COP (110 kDa), γ -COP (98 kDa) et δ -COP (61 kDa), et de trois 'petites' protéines moins bien définies, initialement nommées par leur masse moléculaire approximative : p36, p35 et p20. Ces protéines forment les sous unités d'un complexe, appelé 'coatomer' (Waters et al., 1991). D'autre part, Rothman note que β -COP montre des similitudes avec la β -adaptine, une sous unité du manteau à clathrine. Ceci conforte d'une part le rôle de β -COP en tant que sous unité de manteau, et d'autre part donne une idée générale sur une organisation possible du manteau golgien, en se référant au manteau à clathrine, qui lui est bien connu (Morris et al., 1989). L'existence d'un complexe cytosolique tel que le coatomer, suggère qu'il représente l'unité d'assemblage du manteau des vésicules de transport golgien.

Peu de temps après, Schekman révèle de manière importante que le produit du gène *sec21*, nécessaire dans le transport entre le RE et le Golgi chez la levure, est une sous unité d'un complexe ressemblant au coatomer de mammifère (Hosobuchi et al., 1992). En effet, ce complexe possède une masse de 700 à 800 kDa et nécessite les mêmes étapes de purification que le coatomer. D'autre part un anticorps dirigé contre la protéine β -COP de mammifère reconnaît une sous unité de 110 kDa (c'est-à-dire de même masse moléculaire que β -COP) du complexe de levure contenant Sec21p. Schekman identifie Sec21p comme étant la sous unité γ du complexe. De ce fait, il établit l'existence d'un coatomer chez la levure, et met ainsi en exergue son rôle essentiel dans le transport du fait de sa conservation entre les espèces.

b) Arf1 dans le manteau, l'idée d'un cycle

Arf1 (pour ADP-ribosylation factor 1) est une petite protéine G qui a été initialement identifiée comme un élément clé requis pour l'action de la toxine cholérique dans les cellules de mammifères. En effet, Arf1 est un cofacteur nécessaire à la toxine pour l'ADP-ribosylation de la sous unité α de la protéine G hétérotrimérique G_s , qui active l'adénylate cyclase (Cassel and Pfeuffer, 1978; Kahn and Gilman, 1986). En revanche, son rôle physiologique est encore obscur à cette période, et n'est estimé qu'au début des années 90 par Kahn et ses collaborateurs, qui ont recours à la génétique de la levure (Stearns et al., 1990). Kahn montre premièrement que deux gènes codent pour les protéines Arf dans la levure: *arf1* et *arf2*. Aucun de ces deux gènes n'est essentiel pour la viabilité des cellules, mais la double délétion est fatale. D'autre part, le produit du gène *arf1* représente 90% des protéines Arf dans la levure, et la mutation d'*arf2* n'a pas d'effet phénotypique. Ainsi, Arf2, qui possède plus de

96% d'identité avec Arf1, ne serait qu'une 'roue de secours' dans cet organisme. En revanche, et de manière importante, Kahn révèle que la mutation d'*arf1* engendre des défauts dans la voie de sécrétion de la levure, avec notamment une glycosylation partielle de protéines transportées. De plus, des expériences de microscopie électronique et d'immunofluorescence établissent que la protéine Arf1 est localisée dans le Golgi des cellules de mammifères. En résumé, la petite protéine G Arf1 semble fonctionnellement et physiquement reliée au Golgi.

A cette période, il faut noter que d'autres gènes sont décrits chez la levure, tels que *sec4* ou *ypt1*, codant aussi pour des petites protéines G qui interviennent dans la sécrétion (Bourne, 1988). Cependant, leurs homologues chez les mammifères (les protéines Rab2, Rab5 et Rab7) ont une localisation cellulaire éloignée du Golgi, et donc différente de celle d'Arf1 (Chavrier et al., 1990). Rothman, qui suggère que l'hydrolyse du GTP est nécessaire pour le transport vésiculaire intragolgien, revient alors sur les caractéristiques biochimiques du manteau COP (Serafini et al., 1991a). Premièrement, les 'petites' sous unités du coatomer p36 et p35 sont renommées ϵ -COP et ζ -COP, car elles sont retrouvées dans des vésicules COP issues de différentes espèces, et se distinguent de ce fait de protéines cargo co-purifiées avec le coatomer, qui varient spécifiquement selon l'organisme étudié. Ensuite, Rothman révèle que la protéine p20 lie le GTP. Cette information est capitale, d'autant plus que le GTP est nécessaire pour la liaison de cette protéine aux membranes golgiennes. La seule protéine G d'une vingtaine de kDa, connue à l'époque pour se localiser au Golgi, est Arf1. Et en effet, des anticorps dirigés contre Arf1 le détectent dans les fractions de vésicules recouvertes de manteau en présence de GTP γ S. En fait, Rothman voit Arf1 comme une sous unité structurale de manteau, car d'une part elle n'est plus présente sur les vésicules après son désassemblage, et d'autre part Arf1-GTP γ S est enrichi de manière spécifique dans les vésicules de transport par rapport au reste des membranes golgiennes, avec une stoechiométrie de 3 molécules par sous unité α -COP. De façon intrigante, le prétraitement des membranes golgiennes par la trypsine ou par la température (100°C) inhibe la liaison membranaire d'Arf1 dépendante du GTP γ S. Ceci suggère que cette liaison nécessite un composant protéique préexistant sur la membrane, qui puisse convertir l'état soluble d'Arf1, lié au GDP, en un état membranaire, lié au GTP.

Précisons qu'à cette même période, 5 autres membres de la famille Arf chez les mammifères sont tout juste clonés (Tsuchiya et al., 1991). L'alignement des séquences d'acides aminés des 6 protéines Arf suggère qu'elles peuvent être groupées selon trois classes, reposant sur leur taille et leur degré de similitude : La classe I se compose d'Arf1, Arf2 et Arf3, la classe II d'Arf4 et Arf5, et la classe III d'Arf6. Il est établi qu'Arf1 présente 68%

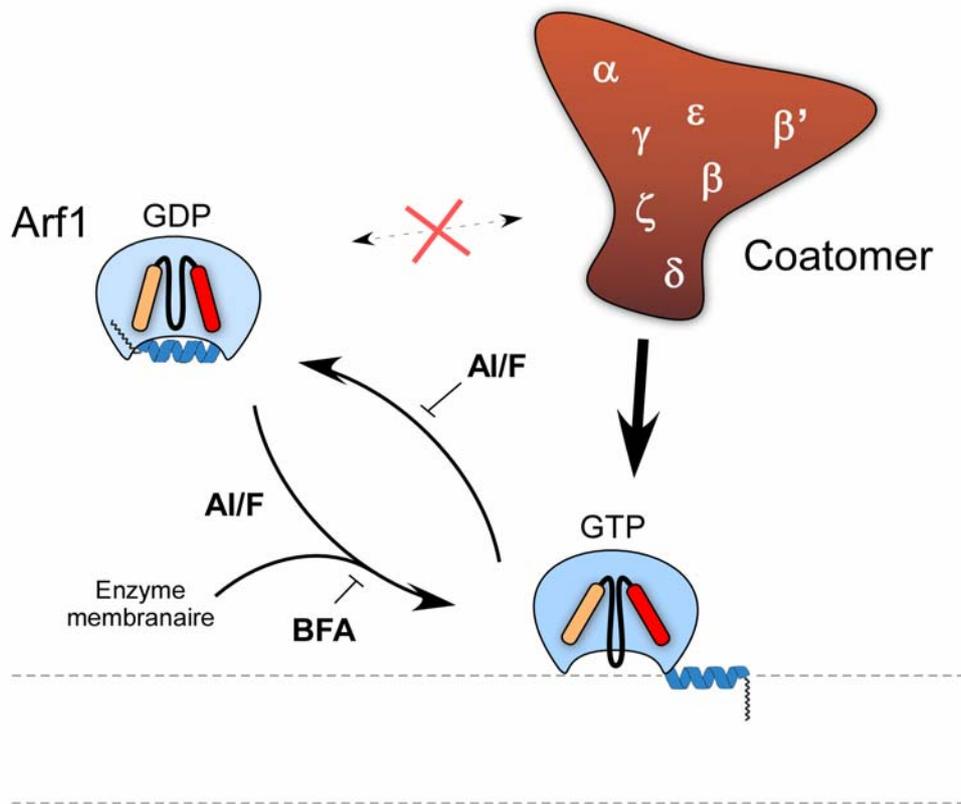


Figure 32 : L'état d'assemblage du coatamer sur la membrane dépend de l'état d'activation de la petite protéine G Arf1 : Seul Arf1-GTP recrute le coatamer (Donaldson et al., 1992). La bréfeldine A (BFA) inhibe l'action d'une enzyme contrôlant l'activation d'Arf1. L'AI/F ($AI F_x$) est utilisé comme analogue non hydrolysable du GTP.

d'identité avec Arf6. Parallèlement à cela, le groupe de Klausner fait une découverte très importante : En nuanciant l'idée qu'Arf1 soit une protéine de manteau en tant que telle, il montre que la petite protéine G Arf1-GTP membranaire est requise pour recruter la protéine β -COP. Klausner donne ainsi pour la première fois un rôle moléculaire à Arf1 (Donaldson et al., 1992). Comme les autres petites protéines de la superfamille Ras connues à cette époque, Arf1 oscille de manière cyclique entre deux états conformationnels distincts, dépendant du nucléotide lié. Tel un interrupteur moléculaire, Arf1 bascule d'une forme active, liée au GTP, en une forme inactive lorsque son GTP est hydrolysé en GDP (Bourne et al., 1990; Bourne et al., 1991). Le groupe de Klausner propose alors un modèle séduisant : L'état conformationnel d'Arf1 pourrait contrôler l'état d'assemblage ou de désassemblage du manteau COP (figure 32). Sa forme active permettrait au manteau de s'assembler de manière stable pour former un bourgeon à la surface de la membrane, alors que l'hydrolyse du GTP d'Arf1 en GDP serait le processus conduisant au désassemblage du manteau. Par ailleurs, l'action préalable d'une enzyme permettrait la liaison membranaire d'Arf1 en contrôlant l'échange GDP/GTP. Curieusement, cette étape peut être inhibée par la bréfeldine A (ou BFA), un métabolite fongique connu pour détériorer dramatiquement la voie de sécrétion. En conséquence, la quantité d'Arf1-GTP lié à la membrane chute considérablement, entraînant la solubilisation du coatomer (Donaldson et al., 1992; Kahn et al., 1992; Lippincott-Schwartz et al., 1989).

Alors qu'une nouvelle sous unité dans le coatomer (β '-COP, 102 kDa) est découverte par l'équipe de Wieland (Stenbeck et al., 1993), une étude menée par Orci montre que les seules protéines cytoplasmiques nécessaires et suffisantes pour l'assemblage du manteau protéique, et pour le bourgeonnement vésiculaire, sont Arf1 et le coatomer (Orci et al., 1993). Ceci suggère manifestement que le manteau COP se forme par autoassemblage. Ce type de processus concerne également le manteau à clathrine, qui est connu à l'époque pour recouvrir les vésicules se formant à la surface cellulaire lors de l'endocytose, et au niveau du TGN, permettant le transport vésiculaire à la sortie du Golgi (Pearse and Robinson, 1990). En fait, les triskèles de clathrine co-polymérisent avec les complexes adaptateurs AP-1 ou AP-2, que l'on retrouve au TGN, ou à la membrane plasmique respectivement. De façon intéressante, les groupes de Kornfeld et de Rothman établissent que le recrutement à la membrane du complexe adaptateur AP-1 requiert la petite protéine G membranaire Arf1-GTP (Stamnes and Rothman, 1993; Traub et al., 1993). Prenant en considération le fait que certaines sous unités des AP (comme la β -adaptine) portent des similitudes avec celles du coatomer, ceci insinue que les différents manteaux utilisent des mécanismes d'assemblage très proches.

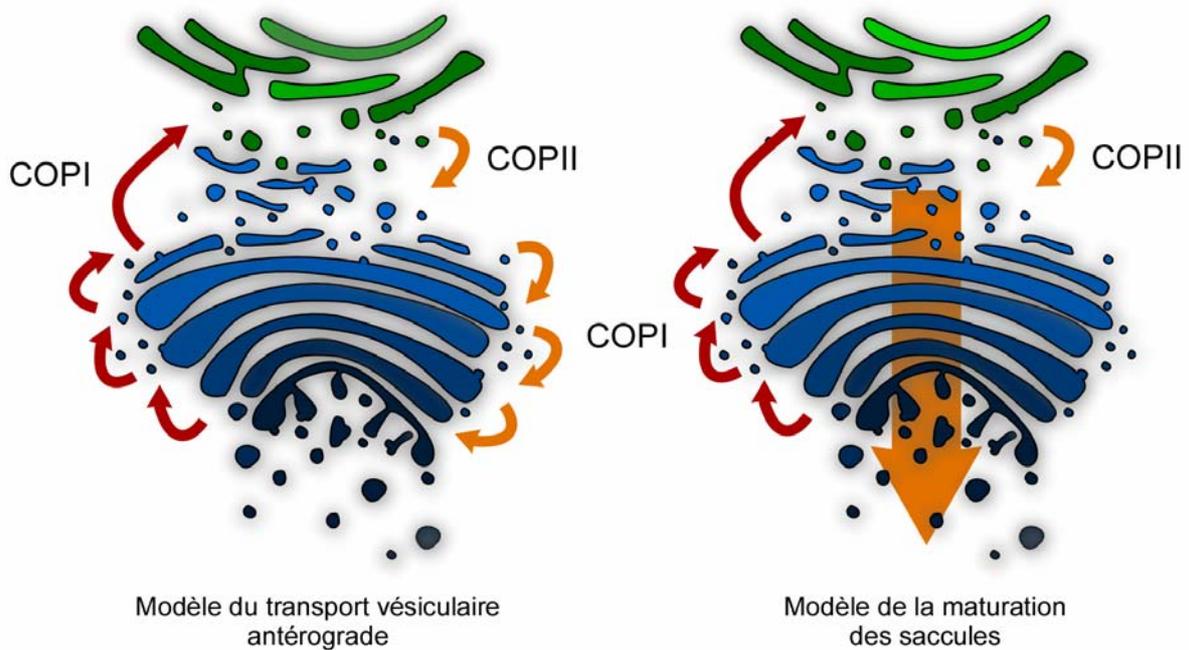


Figure 33 : Les deux modèles de la controverse. Le transport antérograde est illustré en orange, et le transport rétrograde en rouge. Dans le modèle du transport vésiculaire antérograde, les saccules golgiens sont fixes, et le transport dans les deux sens se fait par l'intermédiaire de vésicules COPI. Dans le second modèle, validé aujourd'hui, les protéines sécrétées sont emmenées par le mouvement antérograde des saccules, tandis que les vésicules COPI voyagent dans la direction opposée, et recyclent les protéines golgiennes qui se sont 'échappés' un peu plus tôt par la maturation des citernes, afin que ces protéines gardent leur position dans le Golgi. Le transport antérograde depuis le RE vers le Golgi se fait par transport vésiculaire COPII.

Un an plus tard, Schekman découvre l'existence d'un autre manteau, de composition protéique différente des manteaux COP et à clathrine (Barlowe et al., 1994). Ce nouveau manteau, responsable du bourgeonnement de vésicules à partir du Réticulum Endoplasmique, est à l'origine du transport vésiculaire vers le Golgi. De façon élégante, Schekman montre que les mécanismes moléculaires permettant l'assemblage et le désassemblage de ce manteau sont semblables à ceux du manteau intragolgien COP. En effet, ces mécanismes sont reliés au cycle GTP/GDP de la petite protéine G Sar1. La formation du manteau commence par l'activation de Sar1 à la membrane, qui recrute ensuite deux complexes protéiques (Sec23p/Sec24p et Sec13p/ Sec31p). Schekman appelle ce manteau 'COPII', en référence au manteau COP découvert par Rothman, qui porte désormais le nom de 'COPI'.

Ce n'est qu'en 1995, qu'un rôle fonctionnel est proposé pour Arf6, la protéine G Arf la plus éloignée d'Arf1 chez les mammifères (D'Souza-Schorey et al., 1995; Peters et al., 1995). Des mutations jouant sur le cycle nucléotidique d'Arf6, localisé sur la membrane plasmique et dans le système endosomal, touchent directement la voie d'endocytose. Ceci montre une fois de plus une relation entre le trafic vésiculaire et la régulation de l'activité d'une petite protéine G.

L'existence d'un trafic contrôlé par le manteau COPI n'a jamais été contestée, cependant son rôle dans le transport vésiculaire 'antérograde', qui lui a été attribué depuis le début des années 80, a été remis en cause récemment. En effet, le modèle ancien de « maturation des saccules » est revenu au goût du jour, s'appuyant sur de multiples observations. Par exemple, les vésicules COPI sont d'une manière générale, pauvres en protéines de sécrétion mais riches en protéines golgiennes (Martinez-Menarguez et al., 2001; Orci et al., 1997). Ensuite, la taille de certaines protéines de sécrétion retrouvées dans les saccules semble beaucoup trop grande pour 'rentrer' dans les vésicules de transport (Bonfanti et al., 1998). Par ailleurs, de nombreux travaux indiquent l'existence d'un transport rétrograde intragolgien et entre le Golgi et le RE (Harris and Waters, 1996; Lewis and Pelham, 1990; Lewis and Pelham, 1992; Lippincott-Schwartz et al., 1989). En particulier, Cosson et Letourneur montrent que le manteau COPI fixe directement les motifs de rétention KKXX, nous en reparlerons (Cosson and Letourneur, 1994). Ils ont également fait un crible génétique chez la levure, pour chercher des mutants présentant un défaut dans la rétention, et ont identifié les mutations dans les gènes codant pour les sous unité de COPI (Letourneur et al., 1994).

Dans ce nouveau modèle de maturation, qui finalement réconcilie les deux théories ‘ennemies’, les protéines de sécrétion sont transportées suivant la progression des citernes, alors que les vésicules COPI voyagent dans la direction opposée, d’un saccule ‘tardif’ vers un saccule ‘précoce’, pour recycler des protéines golgiennes (figure 33). Ce modèle explique aussi pourquoi les enzymes golgiennes de glycosylation ne sont pas cantonnées à un saccule donné mais sont réparties selon un gradient de concentration à travers le Golgi (Glick and Malhotra, 1998). Enfin, les progrès techniques récents en imagerie ont permis de suivre en direct la maturation des citernes dans le Golgi de levures, en visualisant des changements dynamiques de distribution en protéines golgiennes dans les saccules en progression (Matsuura-Tokita et al., 2006).

Les années 80 ont été le berceau du trafic vésiculaire. Des équipes ‘pionnières’ comme celles de Rothman, Schekman, Kahn, Klausner ou encore Orci, ont découvert les protéines fondamentales, requises lors du bourgeonnement vésiculaire, ainsi que celles responsables du transport golgien rétrograde. L’idée du lien dynamique existant entre le cycle GTP/GDP de la petite protéine G Arf1 et l’état d’assemblage du manteau COPI a été un élément clé dans la compréhension du transport vésiculaire, et d’autre part a engendré un nombre impressionnant d’études consacrées à la régulation d’un tel phénomène, nous y reviendrons. L’assemblage du manteau protéique COPI, à l’origine des bourgeons membranaires, est un processus d’auto organisation latérale de gros complexes protéiques. Regardons maintenant plus précisément les aspects moléculaires responsables de la formation d’un manteau.

3) Aspects structuraux et fonctionnels du transport vésiculaire COP I

Nous avons vu précédemment que la bascule GDP/GTP d’Arf1 s’accompagne d’un changement conformationnel crucial, qui l’emmène à la membrane, autorisant le recrutement membranaire d’un gros complexe cytosolique de 700 kDa : le coatomer, et ce faisant amorce la construction du manteau protéique COPI. Il existe donc un lien étroit entre le cycle nucléotidique de la petite protéine G et l’état d’assemblage du manteau. Pour appréhender ce mécanisme complexe, regardons tout d’abord l’origine moléculaire de la liaison membranaire d’Arf1, car la régulation de ce processus semble décisive pour la formation d’un bourgeon vésiculaire à la surface de la membrane.

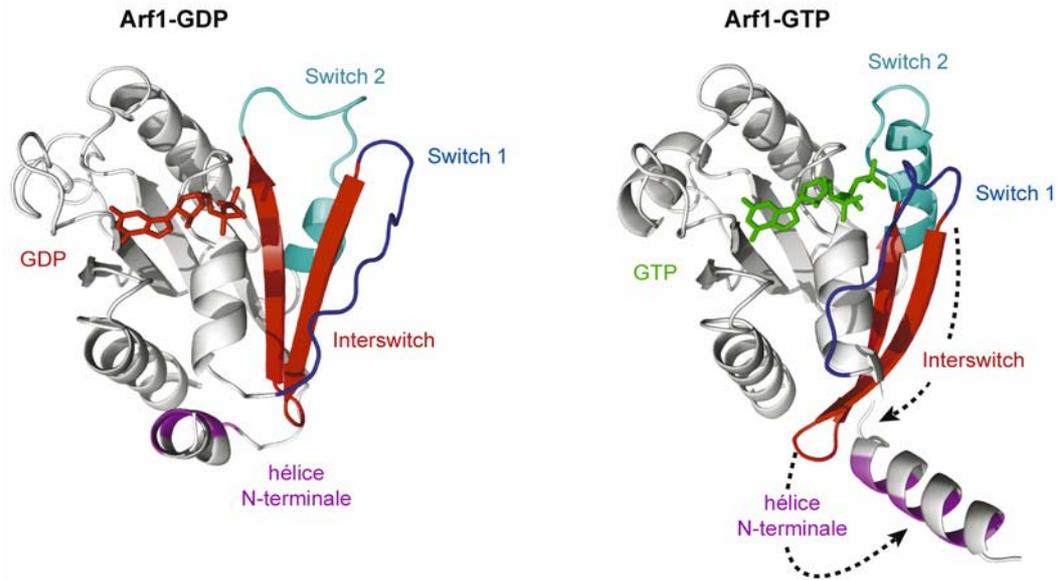


Figure 34 : Structures de la protéine Arf1 liée au GDP et au GTP (Amor et al., 1994 ; Goldberg, 1998). La liaison du GTP provoque le glissement de l'interswitch qui déplace l'hélice amphipathique N-terminale de la poche hydrophobe qu'elle occupe lorsque Arf1 est lié au GDP. (D'après Gillingham et al., 2007).

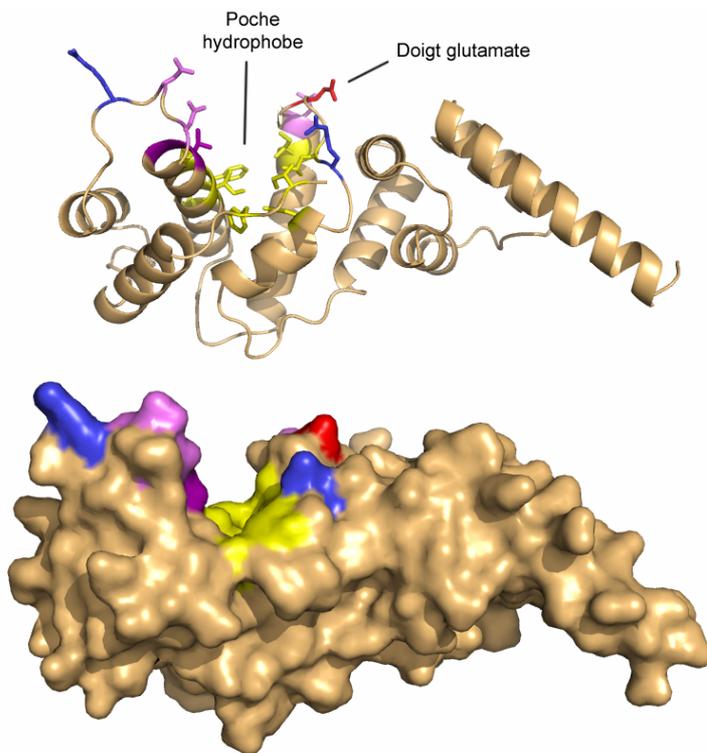


Figure 35 : Structure du domaine Sec7 de la protéine Arno (Cherfils et al., 1998). Une poche tapissée de résidus hydrophobe et dont les bords sont riches en résidus polaires et chargés, constitue le site actif du facteur d'échange. Le 'doigt' glutamate (en rouge), positionné au bord de la crevasse, est critique pour l'action de la protéine.

a) L'activation d'Arf1

La protéine Arf1 est pourvue d'un myristate dans le prolongement de son hélice amphipathique N-terminale. A lui seul, le myristate d'Arf1-GDP ne lui procure qu'une faible attirance pour la membrane (Franco et al., 1995). Cependant, lors de ce contact éphémère avec les lipides de la membrane, la déstabilisation de l'hélice N-terminale d'Arf1 est permise (Beraud-Dufour et al., 1999). En effet, à l'interface membranaire, deux états d'équilibre existent pour l'orientation de cette hélice : Elle peut être enfouie dans une dépression hydrophobe à la surface d'Arf1, comme elle peut interagir avec la membrane (figure 20). La comparaison des structures d'Arf1 lié aux différents nucléotides nous indique que la dépression hydrophobe dans laquelle se loge l'hélice amphipathique quand Arf1 est lié au GDP, n'existe plus dans sa configuration liée au GTP (figure 34). Arf1-GTP est donc membranaire, inéluctablement. En effet, la balance nucléotidique GDP-GTP engendre des transformations structurales spectaculaires dans la protéine, faisant notamment changer de conformation deux régions appelées switch 1 et switch 2. Ceci provoque un glissement de 7 à 8 Å d'une région entre les deux switches ressemblant à une épingle à cheveux, condamnant ainsi la dépression hydrophobe. Cette région, composée de deux brins β (β_1 , β_2) reliés par une boucle (λ_3), est appelée interswitch. L'hélice N-terminale, qui initialement interagit de manière hydrophobe avec la boucle λ_3 dans la structure Arf1-GDP, devient alors entièrement disponible pour interagir avec la membrane dans la configuration GTP (Goldberg, 1998).

L'échange nucléotidique GDP-GTP des protéines de la famille Arf est un processus catalysé par certaines protéines s'associant réversiblement aux membranes, connues sous le nom de GEF (pour Guanine nucléotide Exchange Factor), ou de facteurs d'échange. La famille des facteurs d'échange des protéines Arf compte de nombreux membres, dont la taille et l'organisation varient, mais qui partagent tous la même caractéristique : Ils possèdent un domaine conservé de ~200 résidus portant l'activité catalytique d'échange nucléotidique, le domaine Sec7 (Chardin et al., 1996; Peyroche et al., 1996). La structure du domaine Sec7 du facteur d'échange ARNO est constituée de 10 hélices et se caractérise par une crevasse dont le fond est tapissé de résidus hydrophobes et les bords riches en résidus chargés (figure 35) (Cherfils et al., 1998; Mossessova et al., 1998). Cette crevasse constitue le site actif du domaine Sec7, et interagit avec les régions switch I et II d'Arf1 de manière hydrophobe (Beraud-Dufour et al., 1998; Goldberg, 1998). Notons que la BFA, dont l'action est

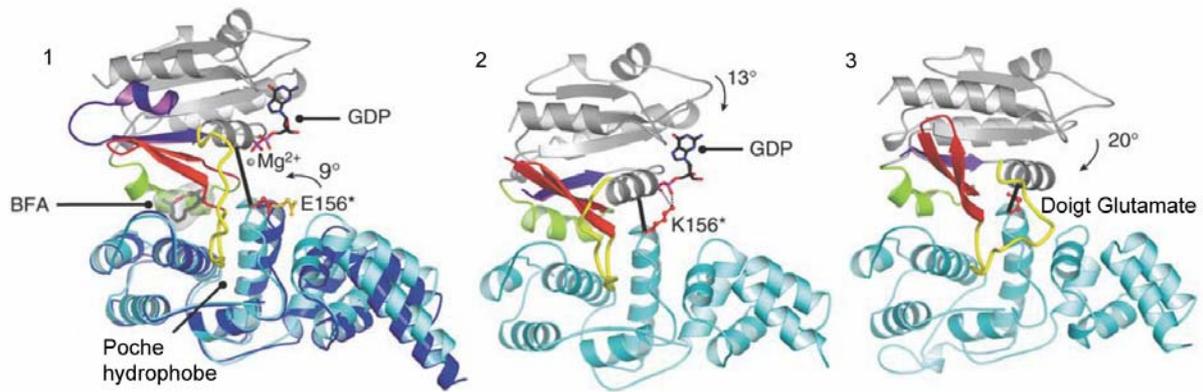


Figure 36 : Différentes structures du complexe entre Arf1 et le domaine Sec7 (Renault et al., 2003 ; Goldberg, 1998). Les régions switch d'Arf1 sont colorées en jaune (switch 1) et vert (switch 2). L'interswitch est en rouge, et la région N-terminale d'Arf1 est colorée en violet. **1.** En présence de BFA, la bascule de la région interswitch est impossible. Le doigt glutamate reste de ce fait distant du site nucléotidique. La structure du domaine Sec7 d'Arno non lié à Arf1 est représentée en superposition (bleu foncé). **2.** La mutation du doigt glutamate 156 en lysine inhibe la dissociation du GDP par le domaine Sec7 d'Arno. **3.** Structure d'Arf1(Δ 17) dans sa forme débarrassée du GDP, complexé au domaine Sec7 de Gea1. Ces trois structures du complexe représentent différents instantanés de la réaction d'échange nucléotidique d'Arf1 par le domaine Sec7. Au cours de cette réaction, Arf1 vient 's'affaisser' sur le doigt glutamate, comme le suggère la rotation de la protéine indiquée par des flèches. (D'après Renault et al., 2003).

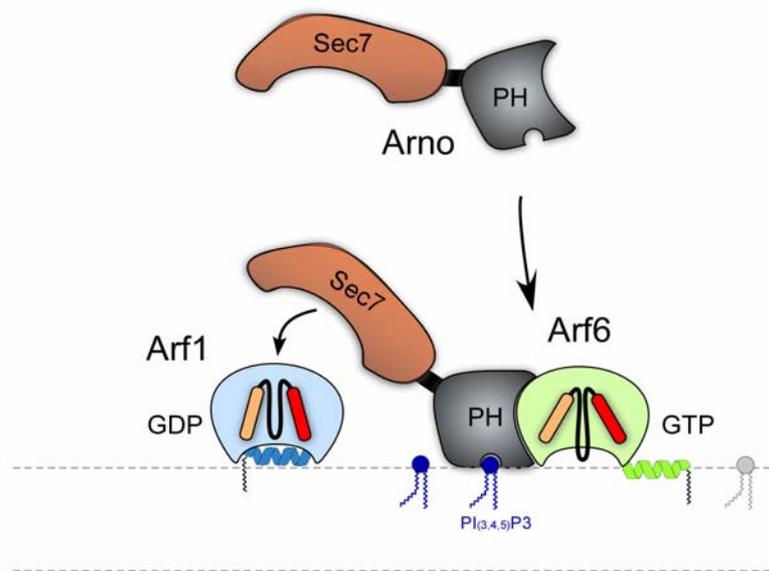


Figure 37 : Modèle d'activation séquentielle d'Arf1 à la membrane plasmique, suite au recrutement d'Arno par Arf6 (Cohen et al., 2007). Le domaine PH d'Arno se lie spécifiquement sur le lipide PI(3,4,5)P3 et reconnaît simultanément la petite protéine G Arf6, c'est un détecteur de coïncidence.

dévastatrice sur la structure et la fonction du Golgi, cible le complexe que forment Arf-GDP et certaines protéines à domaine Sec7 dans les cellules. La BFA peut se glisser à l'interface des deux protéines et ainsi inhiber la réaction catalytique, en stabilisant ce complexe dit 'abortif' (figure 36) (Peyroche et al., 1999; Renault et al., 2003; Robineau et al., 2000). L'interaction du domaine Sec7 d'ARNO avec Arf1-GDP positionne un résidu glutamate (Glu 156) du bord de la crevasse, non loin du Mg^{2+} et du β -phosphate du GDP dans la poche nucléotidique d'Arf. La réorganisation des domaines switches fait 's'affaisser' Arf1 sur le domaine Sec7, entraînant d'une part le glissement de l'interswitch condamnant le retour de l'hélice amphipathique dans son sillon d'origine, et d'autre part une répulsion électrostatique entre la fonction carboxyle du doigt glutamate et le β -phosphate du GDP, qui l'expulse de son site nucléotidique. La mutation en lysine du résidu glutamate 156 du domaine Sec7 d'ARNO annihile son activité d'échange. Suite à la sortie du GDP, les charges du glutamate et du site nucléotidique d'Arf1 s'apparient pour stabiliser la formation d'un complexe vide. Cette série réactionnelle, qui ne dure pas plus de 100 ms, est parfaitement réversible par la liaison d'un nouveau nucléotide, principalement le GTP, puisque plus concentré que le GDP dans le milieu intracellulaire (Goldberg, 1998).

La proximité obligatoire des lipides de la membrane pour l'activation d'Arf1, suggère qu'une localisation périmembranaire soit tout aussi importante pour ses GEFs. Si tous les facteurs d'échanges présentent effectivement une propriété de liaison membranaire, son origine moléculaire n'est pas claire pour la plupart d'entre eux. Est-ce une liaison aux phospholipides, ou sur un récepteur protéique membranaire? L'équation se complique d'autant plus qu'il existe de nombreux GEFs et différents Arfs, répartis dans toute la cellule. Les toutes premières caractérisations biochimiques d'ARNO ont montré l'existence d'un domaine PH dans sa partie C-terminale, qui s'est révélé particulièrement important pour son activité sur Arf1 (Chardin et al., 1996; Paris et al., 1997). En fait, ARNO est exprimé selon deux formes d'épissage, qui diffèrent uniquement par l'insertion d'un résidu glycine dans le domaine PH. Les deux formes possèdent des spécificités de liaison aux phosphoinositides distinctes, qui conditionnent ainsi leur activité d'échange (Casanova, 2007). L'isoforme sans l'insertion (ARNO 2-gly) se lie spécifiquement au $PI_{(3,4,5)}P_3$, alors que l'isoforme ayant une glycine en plus (ARNO 3-gly) se lie avec une affinité comparable au $PI_{(4,5)}P_2$ et au $PI_{(3,4,5)}P_3$ (Macia et al., 2000; Ogasawara et al., 2000). Le $PI_{(3,4,5)}P_3$ est un lipide qui n'apparaît que transitoirement, de manière régulée sur la membrane plasmique, alors que le $PI_{(4,5)}P_2$ y est abondant. Si ARNO se localise effectivement à la membrane plasmique, la spécificité pour

son substrat cellulaire est plus ambiguë (Frank et al., 1998; Macia et al., 2001). En effet, des tests biochimiques montrent qu'ARNO préfère Arf1 plutôt qu'Arf6 comme substrat, mais paradoxalement la localisation cellulaire d'Arf6 à la membrane plasmique suggère plutôt une interaction Arf6-ARNO. Dernièrement, l'équipe de Donaldson semble avoir trouvé la clé du problème, en proposant un modèle séquentiel pour l'activation d'Arf1 : ARNO activerait Arf1 à la membrane plasmique suite à son recrutement par Arf6-GTP (Cohen et al., 2007). De façon intéressante, ARNO interagit avec Arf6-GTP via son domaine PH (et non son domaine Sec7), en présence de phosphoinositides (figure 37). Cette double spécificité de reconnaissance, à la fois pour Arf6 et pour les phosphoinositides, fait de ce domaine PH un senseur multiple de l'état membranaire. Curieusement, il existe d'autres protéines à domaine PH, comme les FAPPs, qui ont la propriété de reconnaître par ce moyen, une protéine Arf activée (en l'occurrence Arf1) et un lipide particulier simultanément (D'Angelo et al., 2007; Godi et al., 2004). Ces protéines agissent comme des 'détecteurs de coïncidence', et sont en mesure d'affermir leur localisation membranaire, précisément là où se trouve le double signal.

L'activation d'Arf1 au Golgi dépend de certaines GEFs golgiennes comme GBF1 et BIG1/2. Ce sont deux grandes protéines bien conservées de plus de 1800 acides aminés, qui contrôlent l'activation des Arf1-5 dans le cis-Golgi et dans le TGN respectivement, leurs homologues chez la levure sont les protéines Gea1/2 et Sec7p. GBF1 est impliqué dans le transport RE-Golgi et intragolgien, il s'associe dynamiquement aux membranes et régule la formation de vésicules COPI. En revanche, BIG1/2 contrôle l'activation d'Arf1 nécessaire à l'assemblage des manteaux à clathrine dans le TGN (Claude et al., 1999; D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Kawamoto et al., 2002). Le mode de liaison de ces protéines sur la membrane est encore inconnu, cependant les événements de bourgeonnement membranaire mentionnés ci-dessus, qu'ils soient contrôlés par le manteau COPI ou à clathrine, s'inscrivent dans un contexte de maturation des citernes golgiennes. En ce sens, les protéines GBF1 et BIG1/2 doivent posséder un senseur de compartiment golgien particulièrement efficace, pour d'une part reconnaître spécifiquement leur compartiment d'action, et d'autre part commuter rapidement sur un autre compartiment 'plus jeune' lorsque le premier progresse dans la maturation. Des mesures récentes indiquent que le facteur d'échange Sec7p de levure permute de citerne toutes les deux minutes (Losev et al., 2006).

L'activation d'Arf1 à la membrane est un processus clé, qui lui permet d'interagir ensuite avec de multiples effecteurs (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Randazzo et al., 2000b). Parmi eux, on compte des régulateurs du métabolisme lipidique qui sont recrutés à la

membrane par Arf1, comme certaines kinases (PI-4-OH kinase et PI₍₄₎P-5-OH kinase) qui génèrent des niveaux élevés en PI₍₄₎P et en PI_(4,5)P₂ dans la membrane (Godi et al., 1999). Arf1 active la phospholipase D (PLD) membranaire, recrutée préalablement par le PI_(4,5)P₂ via un domaine PH, elle génère de l'acide phosphatidique et de la choline en clivant la phosphatidylcholine (Cockcroft et al., 1994). Le PA est un lipide chargé qui possède une tête polaire beaucoup plus petite que le PC, ce qui le rend conique, son enrichissement au détriment du PC modifie donc profondément l'aspect physicochimique de l'environnement lipidique local. Il semble d'une manière générale, qu'Arf1 soit une plateforme centrale du métabolisme lipidique golgien, autour de laquelle s'organisent des mécanismes complexes de rétrocontrôle impliquant diverses protéines et lipides. D'autre part, Arf1 activé interagit avec d'autres effecteurs, comme des protéines d'échafaudage, ou qui le relie au cytosquelette d'actine (Donaldson et al., 2005; Dubois et al., 2005). Ces fonctions d'Arf1, qui assurent le maintien de la structure du Golgi, ne seront pas discutées ici.

b) L'assemblage et la fonction du manteau protéique COPI

Différents manteaux sculptent les membranes à divers endroits de la voie de sécrétion. Le manteau COPII veille à la délivrance des protéines de sécrétion depuis le RE jusque dans le Golgi ; le coatomer qui forme le manteau COPI fonctionne dans le transport vésiculaire golgien rétrograde ; et enfin la clathrine et ses adaptateurs ont le monopole sur tous les événements de transport vésiculaire en aval du Golgi, c'est-à-dire entre les organelles allant du TGN à la membrane plasmique, en passant par le système endosomal et les lysosomes. Le trafic vésiculaire intracellulaire est un flux membranaire puissant, rapide et sélectif. En effet, si le transport entre deux organelles ne dure que quelques secondes, les vésicules lipidiques formées par les manteaux ne prennent en charge que des protéines désignées pour être transportées. De ce fait, l'incorporation de protéines 'résidentes', sans spécificité pour le transport, reste faible dans ces vésicules. Notons que les lipides ne sont pas non plus distribués fortuitement dans la cellule, ce qui implique l'existence d'un tri lipidique spécifique. D'autre part, les protéines amenées à être transportées, des 'cargos' transmembranaires ou solubles, sont enrichies jusqu'à 50 fois dans les vésicules de transport. Cet enrichissement est accompli par des interactions entre les protéines de manteau et des signaux spécifiques de tri, présentés par les extrémités cytoplasmiques des protéines cargos membranaires (Rothman and Wieland, 1996).

La voie rétrograde entre le Golgi et le RE, contrôlée par le manteau COPI, assure le recyclage de protéines qui se sont échappées du RE mais qui normalement y résident. Ces protéines transmembranaires de type I exposent une séquence d'une quinzaine de résidus côté cytoplasme contenant un motif consensus de rétention KKXX_{C-ter} (ou KKKXX_{C-ter}) tout proche de leur extrémité C-terminale, X étant n'importe quel résidu et K des lysines (Jackson et al., 1990). Notons que les lysines sont parfois remplacées par des arginines. En fait, certaines sous unités du coatomeur (α -, β '- et ϵ -COP) lient ce motif, et concentrent ainsi les protéines qui le portent lors de l'assemblage du manteau COPI (Cosson and Letourneur, 1994). Un autre motif constitué seulement de deux résidus phénylalanine (ou d'une phénylalanine accompagnée d'un résidu hydrophobe ou aromatique chez la levure), est aussi reconnu par le coatomeur. Ce type de motif est retrouvé dans le domaine cytoplasmique C-terminal des protéines transmembranaires de la famille p24, et à l'inverse du motif KKXX, les sous unités du coatomeur qui reconnaissent le motif 'FF' sont β -, γ - et ζ -COP (Fiedler et al., 1996). Notons que le motif FF est suivi par 2 ou 3 résidus basiques, qui sont parfois de type KKXX. De façon importante, ces motifs 'discrets' que portent les cargos se lient au coatomeur avec de faibles affinités (de l'ordre du μ M voire du mM), ceci permet au coatomeur de se dissocier facilement de la membrane par la suite, lors du désassemblage du manteau.

Les cargos solubles luménaux, qui ne possèdent pas les signaux cytoplasmiques mentionnés ci-dessus, doivent par contre interagir de manière spécifique avec des récepteurs transmembranaires qui font le lien avec les protéines de manteau. Ces protéines solubles portent un signal de recyclage spécifique, le motif KDEL (ou HDEL chez la levure), qui leur permet d'interagir avec la partie luménale des récepteurs à KDEL. Ces récepteurs sont retenus par le coatomeur, car ils portent un motif dilysine coté cytosol (Lewis and Pelham, 1990; Munro and Pelham, 1987). D'autre part, une étude montre que la liaison d'un ligand luménal sur le récepteur à KDEL déclenche sa prise en charge par les vésicules COPI (Lewis and Pelham, 1992). Cette régulation pourrait découler de l'oligomérisation de ces récepteurs induite par le ligand, stimulant de ce fait leur interaction avec le coatomeur (Majoul et al., 2001). Certes, le manteau se colle aux motifs de ces récepteurs avec une faible affinité, mais ces interactions sont saturables. De ce fait, l'oligomérisation de brins d'une quinzaine de résidus serait plus une gêne pour l'interaction avec le coatomeur qu'un apport en affinité. En effet, plusieurs études montrent que certains canaux ou récepteurs oligomériques de la surface cellulaire ont des sous unités qui présentent des motifs de résidence du RE. Ces motifs sont masqués par effet stérique lorsque les complexes sont correctement assemblés, et ne sont donc pas 'vus' par le coatomeur (Letourneur et al., 1995; Margeta-Mitrovic et al., 2000). Comme si

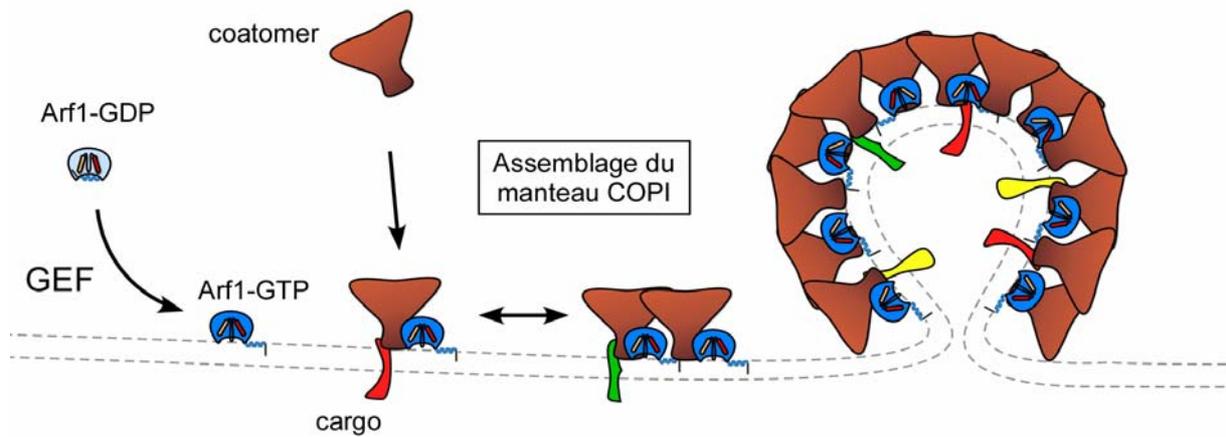


Figure 38 : L'assemblage du manteau protéique COPI. Les complexes 'amorces' formés par le coatomer, Arf1-GTP et un cargo s'assemblent latéralement en polymère. La polymérisation en manteau déforme alors la membrane en structure sphérique de 40 à 70 nm de diamètre.

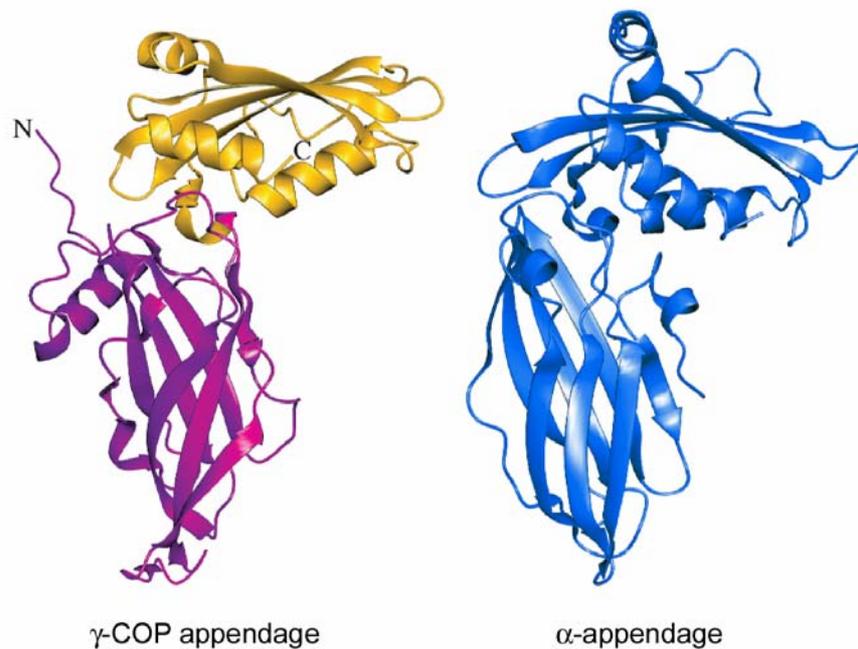
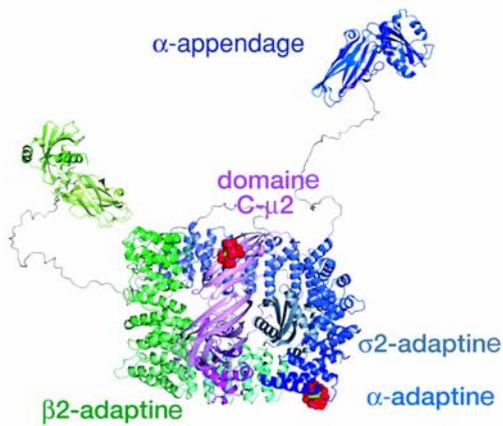


Figure 39 : Structure des domaines appendices de γ -COP et de l' α -adaptine (Watson et al., 2004).

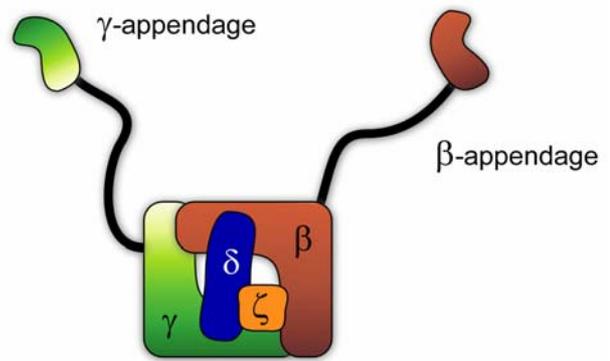
la capture des cargos par le coatomer serait liée à un ‘contrôle de qualité’ ; une sorte de sécurité golgienne visant à ce que ne soient pas délivrées des molécules défectueuses, mal repliées etc.

Outre le rôle dans le recrutement, le tri et la concentration des cargos dans les vésicules de transport, le manteau COPI fournit également l’énergie mécanique qui contraint les membranes à se déformer pour donner naissance à des vésicules de 40 à 70 nm de diamètre. Nous avons vu que l’activation d’Arf1 à la membrane est l’élément critique pour le recrutement du coatomer. Toutefois, des interactions supplémentaires avec des protéines cargos, comme celles de la famille p23/p24 arborant des motifs KKXX, pourraient faciliter sa liaison membranaire (Bremser et al., 1999). Le coatomer, liant à la fois Arf1-GTP et un cargo, forme ainsi un complexe membranaire ‘amorce’ (Springer et al., 1999). Lorsque plusieurs complexes amorces sont constitués, ils s’associent entre eux latéralement pour former un manteau. La polymérisation du manteau déforme alors la membrane en un bourgeon vésiculaire (figure 38). Comment sont régulées toutes ces étapes? Quels sont les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l’autoassemblage du manteau COPI? Aujourd’hui rien n’est vraiment clair, et ce en particulier à cause du nombre très limité de structures cristallographiques établies sur les éléments de ce manteau. Malgré tout, d’abondantes études biochimiques, ainsi que la comparaison avec les autres manteaux, COPII et clathrine, ont permis d’élucider certains aspects du fonctionnement du manteau COPI.

Des indications importantes sur la structuration du coatomer ont tout d’abord été données par un test biochimique simple (Fiedler et al., 1996; Lowe and Kreis, 1995). En amenant la concentration en NaCl à 1M, un complexe partiel formé des sous unités α -, β ’- et ϵ -COP, se sépare du coatomer. Ce trimère, appelé ‘COPI-B’, se réassocie de manière réversible aux autres sous unités du coatomer dans une solution physiologique. Les sous unités β -, γ -, δ - et ζ -COP de l’autre complexe (appelé ‘COPI-F’), portent respectivement des séquences similaires à celles des sous unités α -, β -, μ - et σ -adaptine de l’adaptateur à clathrine AP2 (figures 39 et 40) (Cosson et al., 1996; Duden et al., 1991; Serafini et al., 1991b). De plus, des liaisons entre les sous unités, identifiées en double hybride, indiquent que le tétramère COPI-F s’organise de la même façon que les adaptateurs AP, et la description de la structure cristallographique du domaine ‘appendice’ (*appendage*) C-terminal de γ -COP (résidus 608-874) indique une forme globalement similaire à celle des α - et β -appendage d’AP2 (Eugster et al., 2000; Hoffman et al., 2003; Watson et al., 2004).

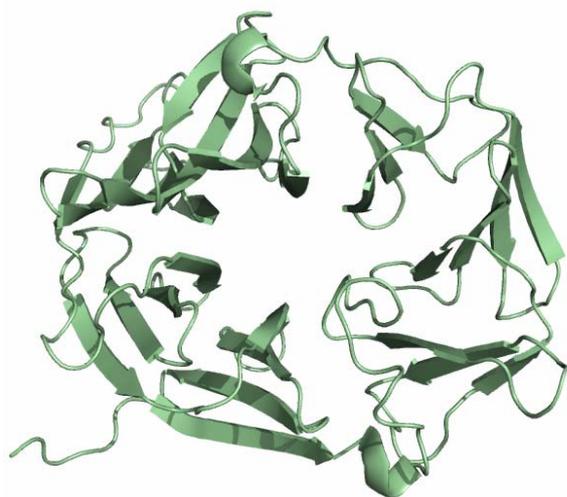


Modèle du
complexe AP2

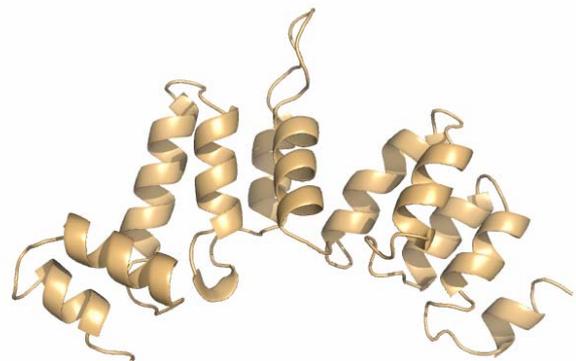


Modèle du
complexe COPI-F

Figure 40 : Modèle du complexe COPI-F basé sur celui du complexe AP2. Les sous unités du complexe AP2 ont été cristallisées indépendamment. Les deux sites de liaison au PI(4,5)P2 d'AP2 sont identifiés par des molécules d'IP6 (en rouge) co-cristallisées avec les sous unités α - et μ -adaptines. (D'après Owen et al., 2004).



β -propeller



α -solénoïde

Figure 41 : Une organisation en 'hélice' (*propeller*) de sept motifs WD40 répétés est prédite pour la région N-terminale des sous unités α - et β '-COP. Des prédictions indiquent aussi que leurs séquences C-terminales pourraient se replier en α -solénoïde. Les structures présentées ici proviennent de la chaîne lourde de la clathrine (ter Haar et al., 1998).

La ressemblance entre les APs et le complexe COP-F est d'autant plus frappante qu'ils interagissent tous avec des petites protéines G de la famille Arf à la surface membranaire. Dans le cis-Golgi, Arf1-GTP recrute le coatomer, via ses régions switch, en interagissant avec les sous unités β -, γ -COP (Oprins et al., 1993; Sun et al., 2007; Zhao et al., 1997). Au niveau du TGN, Arf1-GTP recrute le complexe AP1 (Stamnes and Rothman, 1993; Traub et al., 1993). Et finalement, Arf6-GTP recrute le complexe AP2 à la membrane plasmique (Paleotti et al., 2005). Il faut toutefois noter que la formation de ces 'complexes amorces', impliquant les adaptateurs AP1 et AP2, exige la présence de lipides particuliers dans la membrane. En effet, la sous unité α -adaptine d'AP2 reconnaît spécifiquement le PI_(4,5)P₂, et γ -adaptine d'AP1 se lie au PI₍₄₎P (Owen et al., 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, ces lipides sont des marqueurs de compartiments, et c'est donc la coïncidence de petites protéines G sur ce genre de membranes qui va permettre aux APs de s'y lier de manière spécifique. Le coatomer, en revanche, n'a vraisemblablement pas de spécificité à l'égard de lipides particuliers. Une étude postule néanmoins que la formation de vésicules COPI serait stimulée par la présence d'acide phosphatidique (PA) dans la membrane (Spang et al., 1998). Cependant, un effet indirect du PA, touchant plutôt la liaison d'Arf1 sur la membrane, n'est pas à exclure. D'autre part, une étude récente montre l'existence d'isoformes pour certaines sous unités du coatomer, et notamment pour γ -COP (Moelleken et al., 2007). De façon intéressante, 30% du coatomer cellulaire possède une sous unité γ_2 -COP, et se localise dans le trans-Golgi, à l'inverse de γ_1 -COP qui marque le cis-Golgi. Les différences entre les isoformes γ_1 - et γ_2 -COP ne sont pas claires à ce jour, mais l'existence d'un gradient lipidique traversant le Golgi n'exclut pas un effet direct des lipides sur la localisation plus en trans de γ_2 -COP, sachant que cette sous unité du coatomer est 'l'équivalent' de l' α -adaptine d'AP2.

S'il n'y a aucune donnée cristallographique concernant le complexe COPI-B, des prédictions de structures secondaires sur les sous unités α - et β '-COP indiquent qu'elles comportent des répétitions WD40 sur leurs extrémités N-terminales, et une région en α -solénoïde en C-terminal (Csukai et al., 1997; Devos et al., 2004; Eugster et al., 2000). Ces types de motifs sont conservés, et permettent entre autre l'interaction avec d'autres protéines. Le motif WD40 se compose d'un cœur d'une quarantaine de résidus, formant une succession de 4 brins β antiparallèles structurés en feuillet, bornés souvent par deux doublets d'acides aminés : GH (glycine-histidine) et WD (tryptophane-aspartate). Ces motifs WD40 répétés 6 ou 7 fois s'organisent en 'hélice' (*β -propeller*), dans laquelle chaque 'pale' représente un motif WD40 (figure 41). Les motifs de type α -solénoïde sont un zigzag d'hélices α

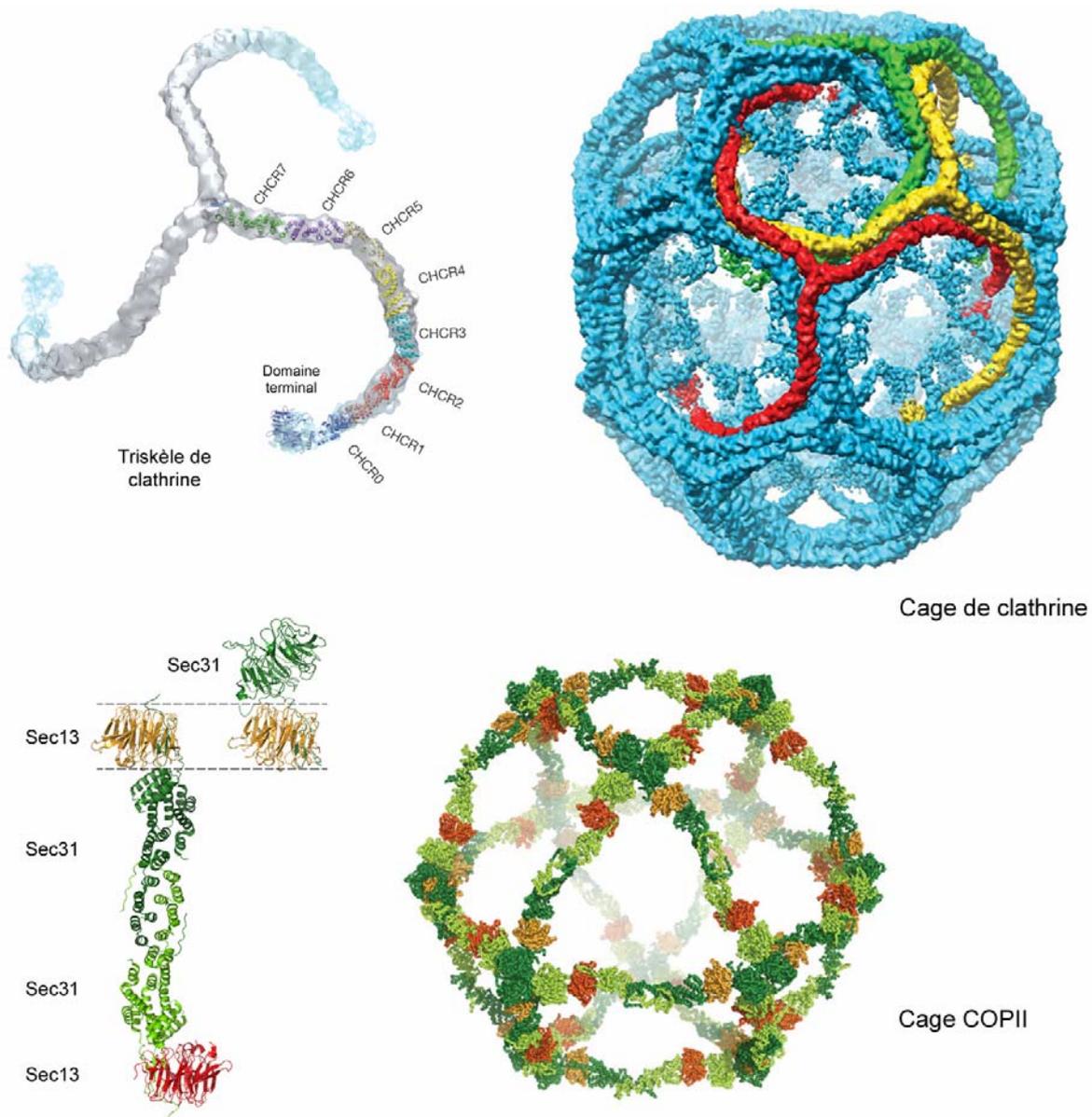


Figure 42 : L'auto organisation de la clathrine et du complexe Sec13/31 (Fotin et al., 2004 ; Fath et al., 2007). La triskèle de clathrine possède trois chaînes lourdes, structurées en répétitions d' α -solénoïdes (CHCR : *clathrin heavy-chain repeat*), se terminant par un domaine structuré en β -propeller. Sec31 est composé d'une région en α -solénoïdes et d'un domaine en β -propeller. Sec13 est un β -propeller. L'autoassemblage des triskèles de clathrine et du complexe Sec13/31 forment des cages sphériques. La cage de clathrine est d'apparence plus stable que la cage COPII.

relativement courtes répétées une dizaine de fois. De façon intéressante, les β -propellers et α -solénoïdes sont des structures retrouvées dans les éléments des autres manteaux protéiques (Fath et al., 2007; Gurkan et al., 2006; Saxena et al., 1996; ter Haar et al., 1998). En effet, une chaîne lourde d'une triskèle de clathrine dispose d'un domaine globulaire terminal constitué d'un β -propeller WD40, et d'un bras agencé en répétitions d' α -solénoïdes (figure 42). De même, les protéines Sec31 et Sec13 du manteau COPII se composent exclusivement de ces motifs. Notons que la triskèle de clathrine et le complexe Sec13/31 sont des éléments qui interviennent seulement une fois que le complexe amorce, décrit plus haut, est édifié sur la membrane. Ils construisent par autoassemblage un 'deuxième étage' du manteau, permettant de réticuler les complexes amorces, qui est indispensable au bourgeonnement vésiculaire (Lee et al., 2005a; Schekman and Orci, 1996). Cette réticulation génère un échafaudage sphérique (une sorte de cage), qui dicte la géométrie de la membrane sous-jacente (figure 42). L'auto-organisation structurale in vitro de la cage COPII a été décrite très récemment, alors que celle de la cage à clathrine est connue depuis plus d'une vingtaine d'années déjà (Fath et al., 2007; Stagg et al., 2006; Vigers et al., 1986). Ces cages sont toutes deux des structures symétriques, mais leur maillage et le mode d'interconnexion de leurs sous unités d'assemblage divergent fortement (Fotin et al., 2004; Gurkan et al., 2006; Stagg et al., 2007). En effet, dans le modèle moléculaire de la cage COPII, les β -propellers des sous unités Sec31 forment (à quatre !) le sommet des arêtes, en ne s'imbriquant pas entre eux. Ceci présuppose que la construction de la cage COPII est basée sur des interactions homotypiques faibles. A l'inverse, chaque sommet d'une cage à clathrine est formé par le centre d'une molécule de triskèle, renforcée par trois chaînes lourdes provenant de trois autres triskèles. D'autre part, alors que les arêtes de la cage COPII sont faites d'un hétérotétramère Sec13/31 de 40Å de diamètre, celles de la cage à clathrine sont formées par un chevauchement de 4 chaînes lourdes, un fagot rigide d' α -solénoïdes de 120Å d'épaisseur, ressemblant à une corde tressée. De plus, il faut seulement 24 arêtes COPII pour construire une cage autour d'une vésicule membranaire de 40 nm de diamètre, alors que 60 arêtes de clathrine sont requises pour recouvrir une même vésicule. Ainsi, avec pourtant des éléments structuraux primaires semblables (des motifs β -propellers et α -solénoïdes), ces deux cages présentent des disparités frappantes en terme de stabilité. De façon intéressante, ces manteaux semblent adaptés à la physico-chimie de la membrane sur laquelle ils travaillent (Antonny, 2006). Le manteau COPII très flexible, agit sur les membranes jeunes et souples du Réticulum endoplasmique, alors que la clathrine agit sur des membranes post-golgiennes, beaucoup plus saturées et donc rigides.

Qu'en est-il pour COPI ? Le trimère COPI-B se compose de deux sous unités pratiquement identiques : α - et β' -COP et d'une sous unité ε -COP plus petite. α - et β' -COP sont organisés en β -propellers et α -solénoïdes, et pourraient avoir un rôle équivalent à Sec13/31 ou aux chaînes lourdes de clathrine. La sous unité ε -COP, serait un renfort de stabilité, comme le sont les chaînes légères de la clathrine. Notons que la délétion des répétitions WD40 sur α -COP ou sur β' -COP est tolérée chez la levure, mais devient létale si elle est réalisée sur les deux sous unités en même temps (Eugster et al., 2004). A la grande différence des autres manteaux, les éléments du manteau COPI sont recrutés en une seule fois sur la membrane, car les domaines 'adaptateur' COPI-F et 'échafaudage' COPI-B du coatomer sont indissociés. Ainsi, l'arrimage du coatomer sur la membrane, contrôlé par son domaine COPI-F, serait directement suivi par son autoassemblage, ordonné par le domaine externe COPI-B. Des données récentes sur des vésicules recouvertes de manteau à clathrine indiquent que le nombre total d'adaptateurs AP2 présents est largement plus faible que celui des triskèles (Cheng et al., 2007). La stoechiométrie entre les éléments du premier étage (Sec23/24) et du second étage (Sec13/31) dans le manteau COPII, n'est probablement pas respectée non plus (Fath et al., 2007). Si cette question ne se pose pas pour le manteau COPI, cela étaye en revanche les nombreuses interrogations qui restent en suspens à ce jour, à propos de l'organisation structurale de ce manteau et de sa stabilité.

En résumé, L'activation d'Arf1 est une réaction moléculaire plutôt complexe, qui est catalysée par des facteurs d'échange membranaires. La bascule GDP/GTP est couplée à un changement de conformation d'Arf1 qui aboutit, par la libération de son hélice amphipathique N-terminale, à son association à la membrane. Arf1-GTP membranaire peut alors interagir avec ses effecteurs. Parmi eux, le coatomer, un complexe protéique 30 fois plus gros qu'Arf1, est recruté depuis le cytosol pour construire le manteau COPI. L'autoassemblage du coatomer en cage sphérique permet d'une part la concentration de protéines cargo sélectionnées, et d'autre part la déformation de la membrane en une structure arrondie. Le bourgeonnement de la membrane induit par le manteau, mène à la formation d'une vésicule de transport dans le cytosol. Il se produit ensuite une réaction qui semble à première vue sans grand intérêt : Arf1 revient à l'état inactif, par hydrolyse de son GTP en GDP, et se dissocie de la membrane, provoquant le désassemblage du manteau. Très tôt pourtant, cette réaction s'est avérée importante, car requise pour qu'ait lieu la fusion de la vésicule avec le compartiment cible (Rothman, 1994). La simplicité apparente de la réaction d'hydrolyse du GTP d'Arf1 est trompeuse, car elle intervient non pas comme un événement isolé, mais dans le contexte très

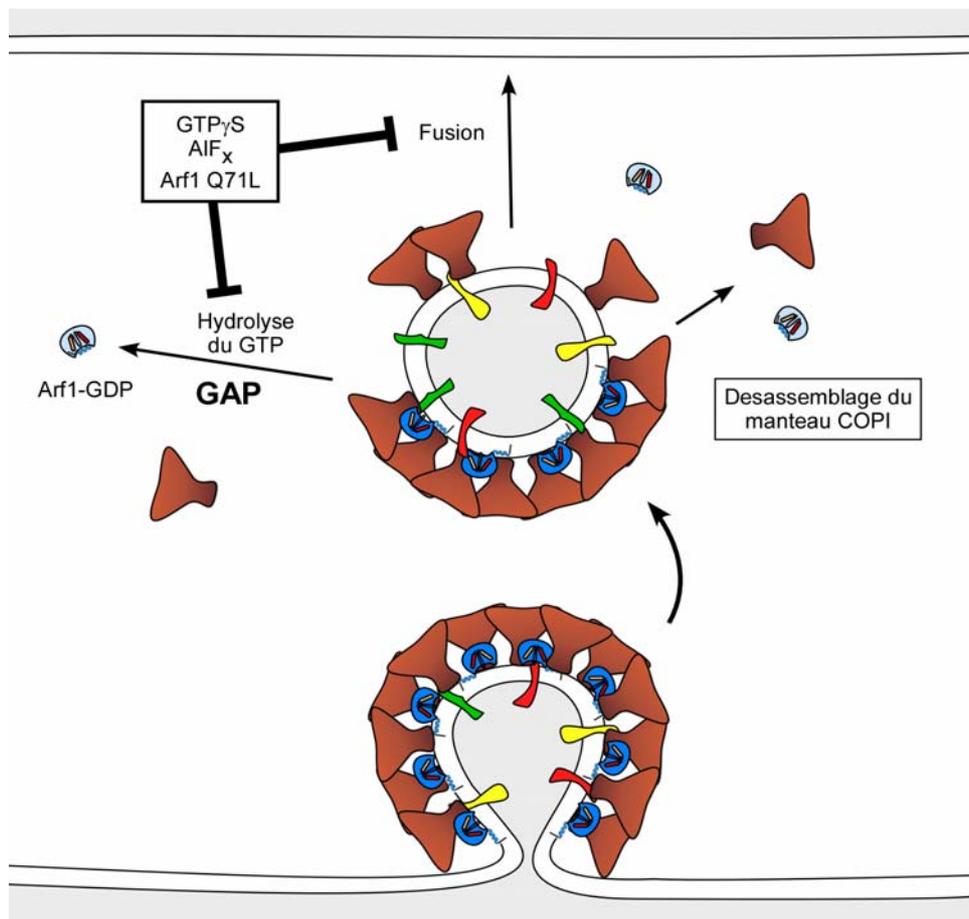


Figure 43 : L'hydrolyse du GTP d'Arf1 est requise pour le désassemblage du manteau, et pour la fusion de la vésicule avec son compartiment cible. Une protéine GAP (*GTPase Activating Protein*) est nécessaire pour désactiver Arf1 car son activité GTPase intrinsèque est presque nulle.

spécial d'un manteau polymérisé qui recouvre la membrane. Je vais maintenant aborder cette problématique, en introduisant les protéines qui catalysent l'hydrolyse du GTP, et en insistant sur celle qui m'intéresse plus particulièrement, ArfGAP1.

4) L'hydrolyse du GTP d'Arf et le désassemblage du manteau COPI

L'utilisation du mutant Q71L d'Arf1, qui reste lié au GTP sans permettre son hydrolyse, ou celle d'analogues non hydrolysables comme le GTP γ S ou l'AlF_x, entraîne l'accumulation de vésicules recouvertes de manteau et empêche le transport. Dans ces conditions, le manteau reste attaché à la vésicule formée, et celle-ci ne peut fusionner avec le compartiment cible. Ces expériences indiquent donc que l'hydrolyse du GTP d'Arf1 est requise dans le désassemblage du manteau COPI (figure 43) (Finazzi et al., 1994; Tanigawa et al., 1993).

L'activité GTPase intrinsèque d'Arf1 est pratiquement indétectable, ce qui rend nécessaire son interaction avec une protéine GAP (GTPase-activating protein) pour accélérer l'hydrolyse de son GTP (Randazzo and Kahn, 1994). En 1995, alors que plusieurs GAP sont déjà connues pour des protéines G de la famille Ras, Cassel et son équipe purifient à partir de foie de rat la première GAP d'Arf. Son activité est observée sur Arf1-GTP myristoylé, en présence de micelles mixtes de détergents et de phospholipides (Makler et al., 1995). Le clonage de cette protéine de 415 résidus, appelée ArfGAP1, révèle qu'elle ne présente pas d'homologie avec des GAPs d'autres petites protéines G, mais possède un fort degré de similitude avec les protéines Gcs1p et Glo3p de levure (48% et 46% d'identité respectivement, et 70% de similarité), qui ont également une activité GAP sur Arf (Poon et al., 1996). Cette ressemblance est particulièrement frappante au niveau de la région N-terminale de ces protéines, où se situe un motif conservé CXXCX₁₆CXXC qui se replie en domaine à doigt de zinc (X étant n'importe quel résidu, C une cystéine). L'utilisation d'anticorps dirigés contre ArfGAP1 montre que sa localisation subcellulaire se superpose remarquablement à celle de β -COP dans le Golgi (Cukierman et al., 1995). Par ailleurs, sa surexpression dans les cellules conduit à un effet de type BFA : Le coatome se détache des membranes intracellulaires et se disperse dans le cytosol (Aoe et al., 1997). Donc, cette GAP semble être le bon candidat pour réguler la désactivation d'Arf1 dans le Golgi.

Des études de délétion et de mutagenèse indiquent que le domaine catalytique minimal d'ArfGAP1 correspond aux 146 premiers résidus de la protéine, et que son architecture

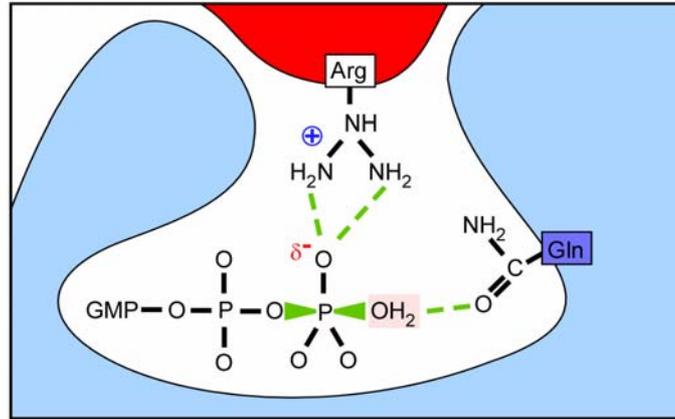
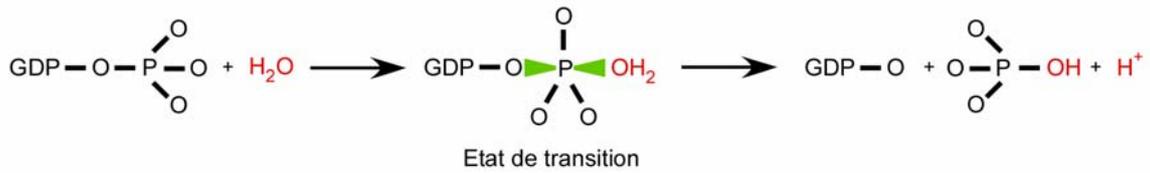


Figure 44 : L'hydrolyse du GTP. La protéine GAP (en rouge) stimule l'hydrolyse du GTP de la petite protéine G (en bleu) en stabilisant l'état de transition de la réaction décrite au dessus. Un 'doigt' arginine pointe vers le site nucléotidique et neutralise les charges négatives du γ -phosphate. La glutamine 71 de la protéine Arf1 stabilise la molécule d'eau.

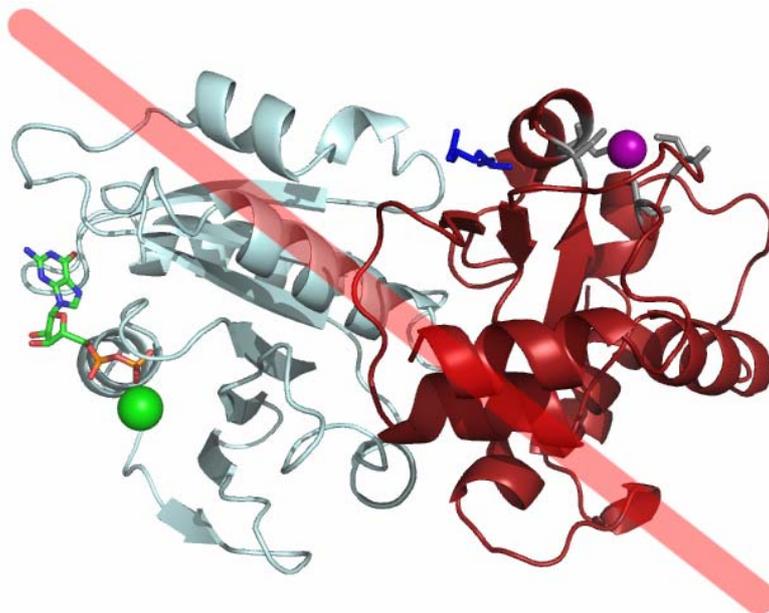


Figure 45 : Structure (fausse) du complexe entre Arf1 (en bleu clair) et ArfGAP1 (rouge) (Goldberg, 1999). Les cystéines formant le domaine à doigt de zinc sont colorées en gris, l'atome de zinc est en violet. Le résidu arginine 50 conservé de la protéine ArfGAP1 (représenté en bleu foncé) est bien loin du site nucléotidique d'Arf1 dans cette structure.

globale est maintenue par le domaine à doigt de zinc. En effet, des mutations touchant les cystéines de ce domaine déstabilisent la molécule et entraînent une perte totale de l'activité catalytique d'ArfGAP1 (Cukierman et al., 1995; Goldberg, 1999). De plus, un résidu arginine (Arg50), retrouvé en aval du domaine à doigt de zinc, paraît essentiel pour l'activité GTPase d'ArfGAP1 (Szafer et al., 2000). De façon intéressante, de nombreuses protéines GAP portent un résidu arginine caractéristique, appelé 'doigt arginine', qui serait directement impliqué dans la réaction d'hydrolyse du GTP (Scheffzek et al., 1998). Comme l'indiquent les structures des complexes entre Ras ou Rho et leurs GAPs, le groupe guanidinium de la chaîne latérale de ce 'doigt arginine' pointe vers le site actif et crée des ponts hydrogènes qui neutralisent les charges négatives développées par le γ -phosphate pentavalent lors de l'état de transition (figure 44) (Rittinger et al., 1997; Scheffzek et al., 1997). En stabilisant l'état de transition, la GAP amène ainsi la réaction d'hydrolyse jusqu'à son terme. Notons que les structures cristallographiques des complexes protéine G/GAP ont été réalisées avec de l' AlF_x , qui peut mimer le γ -phosphate lors de l'état de transition.

Goldberg publie en 1999 la structure cristallographique du complexe entre Arf1 et le domaine catalytique d'ArfGAP1 (figure 45) (Goldberg, 1999). Toutefois celle-ci paraît incohérente pour plusieurs raisons : Premièrement, le résidu arginine invariant d'ArfGAP1 est très éloigné du site nucléotidique d'Arf1, et n'a ici qu'un rôle 'structural'. Pourtant, ce résidu est crucial pour l'activité de cette protéine, et pour celle d'autres Arf GAP (Jackson et al., 2000; Mandiyan et al., 1999; Randazzo et al., 2000a). De plus, la structure du complexe Arf1-ArfGAP1 est réalisée avec de l'Arf1-GDP sans AlF_x , c'est-à-dire avec le produit de la réaction qui n'a, a priori, pas d'affinité avec la GAP. Enfin, la superposition des domaines GAP d'ArfGAP1 et de PAP β , une autre Arf GAP, fait également se superposer Arf1-GDP avec le domaine C-terminal de PAP β (Mandiyan et al., 1999). Donc, à en croire la structure du complexe, l'interface d'Arf1 avec le domaine GAP des protéines PAP β et ArfGAP1 devrait être différente. Or, ces deux protéines Arf GAP possèdent des domaines catalytiques hautement similaires. Bref, la structure que propose Goldberg ne représente pas un vrai intermédiaire dans la réaction d'hydrolyse, et de ce fait, il n'existe aucune représentation structurale définissant clairement l'organisation spatiale du complexe Arf1-ArfGAP1 à ce jour.

Les protéines Arf GAP, nombreuses dans la cellule, ont toutes un domaine catalytique dont la structure est bien conservée. En revanche leur partie non catalytique est extrêmement variable d'une GAP à l'autre. Ces variations concernent leur taille ainsi que leur organisation. En effet, la partie non catalytique peut être composée de différents domaines fonctionnels,

Sous type	Arf GAPs	Synonyme
(Type ArfGAP1)		
ArfGAP	ArfGAP1	ARF1GAP / MGC39924 / HRIHFB2281
	ArfGAP3	ARFGAP1
SMAP	SMAP1	FLJ13159 / FLJ42245
	SMAP2	BRD8 / p120 / Smap1l
GIT	GIT1	Cat-1 / p95-APP1 / KIAA0148 / MGC760
	GIT2	Cat-2 / p95-APP2 / PKL
(Type AZAP)		
ASAP	ASAP1	AMAP1 / DDEF1 / DEF1 / PAG2 / Centaurin beta4 / Shag1 / KIAA1249
	ASAP2	PAP / AMAP2 / DDEF2 / PAG3 / Centaurin beta3 / FLJ42910 / Gm1523 / Gm592 / MGC90837
	ASAP3	DDEF1 / UPLC1 / ACAP4 / FLJ20199 / Gm140 / MGC102639
ACAP	ACAP1	Centaurin beta1 / KIAA0050 / MGC25782 / MGC47358
	ACAP2	Centaurin beta2 / KIAA0041
	ACAP3	Centaurin beta5 / KIAA1716
ARAP	ARAP1	Centaurin delta2 / KIAA0782
	ARAP2	Centaurin delta1 / FLJ13675 / FLJ44916 / KIAA0580 / PARX
	ARAP3	Centaurin delta3 / DRAG1 / FLJ21065 / KIAA4097
AGAP	AGAP1	Centaurin gamma2 / GGAP1 / KIAA1099 / MGC71657
	AGAP2	Centaurin gamma1 / FLJ16430 / GGAP2 / KIAA0167 / PIKE
	AGAP3	Centaurin gamma3 / CRAG / FLJ16146 / MRIP-1 / MGC37541

Figure 46 : Les différentes protéines ArfGAPs et leurs synonymes. Les ArfGAPs sont classifiés selon deux grands groupes, et divisés en sept sous types basés sur leur organisation structurelle. (D'après Inoue et al., 2007).

comme être totalement déstructurée. Mais dans tous les cas, cette partie de la protéine est importante pour sa localisation cellulaire, et pour la régulation de son activité.

a) Les protéines Arf GAPs

Selon leur organisation structurale, les protéines Arf GAPs peuvent être partagées en deux groupes distincts : Les protéines du premier groupe ont un domaine GAP N-terminal, alors que dans celles du deuxième groupe, ce domaine est plutôt central, entouré d'un domaine PH, et de domaines ankyrine répétés (figures 46 et 47) (Inoue and Randazzo, 2007).

Le premier groupe correspond aux Arf GAPs de « type ArfGAP1 », et comprend les familles ArfGAP, SMAP et GIT. La famille **ArfGAP** comporte les protéines ArfGAP1, ArfGAP2 et 3, qui ont la particularité de ne pas posséder de domaine structuré dans leur partie non catalytique, leurs homologues chez la levure sont les protéines Gcs1p et Glo3p. Je reviendrai sur la protéine ArfGAP1 et sur sa régulation dans ce chapitre. Le cas des protéines ArfGAP2 et 3 sera traité dans le dernier chapitre de ma thèse. La famille **SMAP** comprend les protéines SMAP1 et SMAP2, qui sont les GTPases respectives d'Arf6 et d'Arf1 (Natsume et al., 2006). Les SMAPs sont des protéines bien conservées dans l'évolution, leurs homologues dans la levure sont Age1p et Age2p. Elles lient la clathrine in vitro grâce à une domaine conservé en C-terminal, suggérant qu'elles sont recrutées sur les vésicules recouvertes de clathrine dans la cellule. SMAP2 se colocalise avec l'adaptateur AP1 dans le réseau endosomes précoces/TGN, et fonctionnerait dans le transport vésiculaire rétrograde endosomes-TGN. Les protéines GIT1 et GIT2 qui constituent la famille **GIT**, ne semblent pas avoir de préférence pour un Arf particulier in vitro, mais se localisent in vivo à la membrane plasmique avec Arf6. D'autre part, les différents domaines protéiques des GITs leur permettent d'abord d'être recrutés aux adhésions focales de la cellule par des protéines du cytosquelette, pour ensuite interagir avec un facteur d'échange de la petite protéine G Rho, PIX, qui régule la migration et l'étalement de la cellule (Hoefen and Berk, 2006). Le rôle des GIT en tant que GAP d'Arf6, non requis dans ces événements, pourrait en revanche réguler indirectement la distribution de Rac et contribuer à la polarité cellulaire lors de la migration (Nishiya et al., 2005). Bref, un 'cross talk' semble s'opérer entre les petites protéines G des familles Arf et Rho à travers les GITs.

Le deuxième groupe correspond aux Arf GAPs de « type AZAP », dans lequel on trouve les familles ASAP, ACAP, ARAP et AGAP. Les AZAP sont des protéines multi domaines, sur lesquelles ont retrouvé différents domaines de liaison membranaire, qui leur permettent

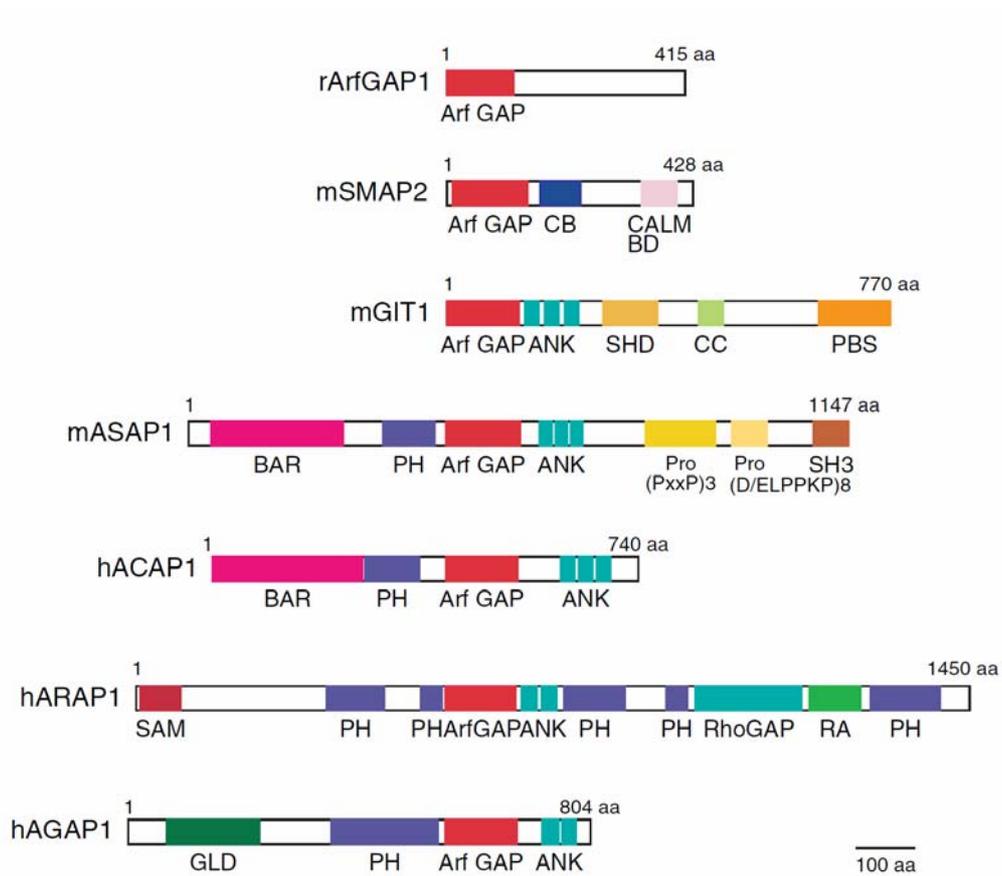


Figure 47 : Organisation structurale des ArfGAPs. Arf GAP : Domaine ArfGAP ; CALM : CALM binding domain ; CB : Clathrin box ; CC : Coiled-coil ; Pro: Prolin-rich domain ; ANK: Ankyrin domain ; h : Human ; m : Mouse. (D'après Inoue et al., 2007).

d'agir comme détecteur de coïncidence à la surface d'une membrane, ainsi que des domaines de liaison à d'autres protéines telles que les répétitions ankyrines. La famille **ASAP** compte les protéines ASAP1 (ou Centaurin β 4), ASAP2 (ou Centaurin β 3, PAP β) et ASAP3 (ou DDEFL1). Elles semblent préférer Arf1 et Arf5 plutôt qu'Arf6, et se lient au PI_{(4,5)P2} grâce à leur domaine PH (Furman et al., 2002; Kam et al., 2000). Notons que ces protéines possèdent aussi un domaine BAR qui permet de déformer localement la membrane de manière sphérique ou, dans certains cas, de sentir son état physique (je reviendrai sur ces domaines BAR dans le prochain chapitre). Les protéines **ACAP** (ACAP1, 2, 3 ou Centaurin β 1, 2, 5) ressemblent beaucoup aux ASAP, mais préfèrent Arf6 plutôt qu'Arf1, et se lient au PI_{(3,5)P2} en plus du PI_{(4,5)P2} (Jackson et al., 2000). Avec 1450 acides aminés, les **ARAPs** sont les plus grands des Arf GAPs. Ces protéines ont la particularité de contenir un domaine Rho GAP également. Elles portent 5 domaines PH, qui les rendent dépendantes du PI_{(3,4,5)P3}. Les ARAP1 (Centaurin δ 2) et 2 (Centaurin δ 1) fonctionnent sur Arf1, alors que ARAP3 (Centaurin δ 3) est une GAP d'Arf6. Ces protéines ARAP couplent ainsi la signalisation des phosphoinositides aux événements de transport vésiculaire et d'organisation du cytosquelette d'actine (Santy and Casanova, 2002; Yoon et al., 2006). Les protéines de la famille **AGAP** (AGAP1, 2, 3 ou Centaurin γ 2, 1, 3) sont stimulées par le PA et le PI_{(4,5)P2}, et fonctionnent dans les endosomes sur Arf1 et 5 préférentiellement. Elles possèdent en amont de leur domaine PH, un curieux domaine GLD (GTP-binding protein-like domain), qui mime une petite protéine G (Nie et al., 2002). Le domaine GLD d'AGAP1 possède 51% de similitude et 27% d'identité avec K-Ras, mais ne lie pas de nucléotide et ne possède pas les propriétés de transduction de Ras. En revanche, sans ce domaine, AGAP1 hydrolyse le GTP d'Arf1 sans que le PA soit requis. Le domaine GLD semble donc induire la dépendance au PA pour cette GAP, en inhibant peut être le domaine PH adjacent. D'autre part, ce domaine PH permet aux protéines AGAP1 et AGAP2 d'interagir respectivement avec les adaptateurs à clathrine AP3 et AP1 (Nie et al., 2003; Nie et al., 2005).

En conclusion, de nombreuses Arf GAPs existent, et semblent agir aux quatre coins de la cellule. Alors que certaines d'entre elles affectent les structures d'actine du cytosquelette, permettant à la cellule de changer de forme ou bien de migrer, d'autres Arf GAPs contrôlent le trafic vésiculaire des voies de sécrétion et d'endocytose. Je ne discuterai pas d'avantage de l'ensemble de ces protéines Arf GAP, mais plutôt de celle qui a captivé mon attention lors de ma thèse : ArfGAP1. Regardons maintenant comment fonctionne plus précisément cette GAP dans le système golgien COPI.

b) Réguler la fonction d'ArfGAP1 : Une interaction protéine-protéine ?

Cassel et son équipe montrent en 1995 que la BFA, connue pour inhiber certaines protéines GEF golgiennes d'Arf, entraîne une redistribution d'ArfGAP1 depuis le Golgi vers le cytoplasme. Ceci suggère qu'un mécanisme dépendant d'Arf1 soit responsable du recrutement d'ArfGAP1 au Golgi (Cukierman et al., 1995).

Plusieurs études évoquent l'existence d'une interaction directe entre ArfGAP1 et le coatomer ; un événement qui se déroulerait sur la membrane, avec la participation d'Arf1. En effet, des travaux réalisés dans notre laboratoire indiquent qu'ArfGAP1, le coatomer et Arf1-GDP myristoylé en présence d' AlF_x , forment un complexe tripartite sur des liposomes (Bigay et al., 2003). Notons que l'élimination de l'une de ces trois molécules empêche la création d'un complexe dans ces conditions. D'autre part, des expériences d'immunoprécipitation ont également révélé l'interaction entre ArfGAP1 et le coatomer sur des membranes golgiennes de différentes cellules (Liu et al., 2005). De plus, le traitement à la BFA de ces membranes avant l'expérience prévient cette interaction, confirmant sa dépendance vis-à-vis d'Arf1-GTP membranaire. L'utilisation de différentes constructions d'ArfGAP1 indique que cette interaction impliquerait au moins deux sites de liaison au coatomer sur ArfGAP1, le premier dans son domaine catalytique, et le second dans sa partie non catalytique (Lee et al., 2005c).

Cette interaction entre le coatomer et ArfGAP1 semble stimuler la réaction d'hydrolyse du GTP d'Arf1. En effet, Goldberg révèle que l'ajout de coatomer en quantité stoechiométrique par rapport à Arf1 augmente l'activité de catalyse d'ArfGAP1 (résidus 6-136) de trois ordres de grandeur (Goldberg, 1999). Ces expériences ont toutefois été réalisées en solution, en ayant recours à un Arf1-GTP tronqué de ses 17 premiers résidus (Arf1 Δ 17, soluble). Des expériences utilisant cette fois de l'Arf1-GTP myristoylé, lié sur des membranes golgiennes, montrent que le coatomer a un effet beaucoup plus modeste sur la réaction GTPase catalysée par ArfGAP1 (résidus 1-257 ou forme entière), en la stimulant deux fois tout au plus (Szafer et al., 2000; Szafer et al., 2001).

Curieusement, le recrutement d'ArfGAP1 et/ou son activité d'hydrolyse du GTP pourraient avoir un rôle dans la capture de cargos dans les vésicules en formation. En effet, des études montrent précisément que la quantité de cargos arborant le motif KKXX est fortement réduite lorsque le GTP γ S ou Arf1 Q71L sont utilisés (Lanoix et al., 1999; Nickel et al., 1998; Pepperkok et al., 2000). D'autre part, ArfGAP1 semble se lier, par sa région C-terminale, sur les motifs dilysine de récepteurs à KDEL, tels que ERD2 (Yang et al., 2002). Cette interaction pourrait avoir une fonction dans le transport vésiculaire rétrograde de ligand

portant le motif KDEL, toutefois les données existantes concernant le mécanisme d'un tel phénomène restent vagues (Aoe et al., 1997; Aoe et al., 1999; Majoul et al., 2001).

L'interactivité entre ArfGAP1 et le coatomer, ainsi que le rôle d'ArfGAP1 dans la capture des cargos soulèvent des questions fondamentales. Premièrement, comment un manteau d'une taille acceptable peut se former à la surface d'une membrane, si pendant ce temps, ses unités élémentaires interagissent avec la protéine qui les conduit à se dissocier de cette membrane ? D'autre part, comment expliquer qu'une protéine, dont le rôle est prédit comme étant 'terminal' dans la formation d'une vésicule, à savoir le désassemblage du manteau, semble avoir un rôle essentiel dès ses premières étapes ? De toute évidence, il existe un mécanisme qui régule de manière spatio-temporelle la réaction d'hydrolyse du GTP d'Arf1 par ArfGAP1. L'idée que la réaction de GTPase puisse être 'freinée' a premièrement été proposée par Goldberg en 2000. Il montre qu'en se liant au coatomer, la partie cytosolique de la protéine cargo p24a/p24 β ₁ réduit considérablement l'effet du manteau sur l'hydrolyse du GTP d'Arf1 par ArfGAP1, alors que d'autres protéines cargos de la même famille, ou portant le motif KKXX, en sont incapables (Goldberg, 2000). Goldberg suggère qu'en inhibant la réaction GTPase, ces cargos pourraient fournir une marge de temps supplémentaire pour que leur capture dans les vésicules en formation soit effective, et pour que le manteau ne se dissocie pas prématurément. Si l'idée est intéressante, il faut toutefois rester prudent vis-à-vis des résultats apportés par cette étude : Ici, les expériences sont réalisées entièrement en solution, et dans des conditions tout à fait 'non physiologiques' ! Une étude ultérieure, réalisée cette fois en présence de membranes golgiennes, indique que les cargos p24 β ₁ se lient directement à ArfGAP1, et entraînent l'inhibition de son activité d'hydrolyse, indépendamment du coatomer (Lanoix et al., 2001). Ce système suggère que la dissociation rapide du coatomer par ArfGAP1 est autorisée en l'absence de 'bons' cargos, pour qu'il puisse être recyclé, afin de se polymériser sur une zone membranaire où le transport est utile. Si la distribution de la réaction GTPase est ici contrôlée dans l'espace et dans le temps, ceci n'explique pourtant pas la capture de cargos qui ne contiennent pas précisément le type de cargo p24. D'autre part, de manière troublante, la suppression des huit gènes codants pour les protéines p24 dans la levure n'a aucun effet sur sa viabilité, et n'est associée qu'à des effets mineurs de sécrétion (Springer et al., 2000). Bref, la fonction exacte de ces protéines dans la régulation d'ArfGAP1 est toujours controversée.

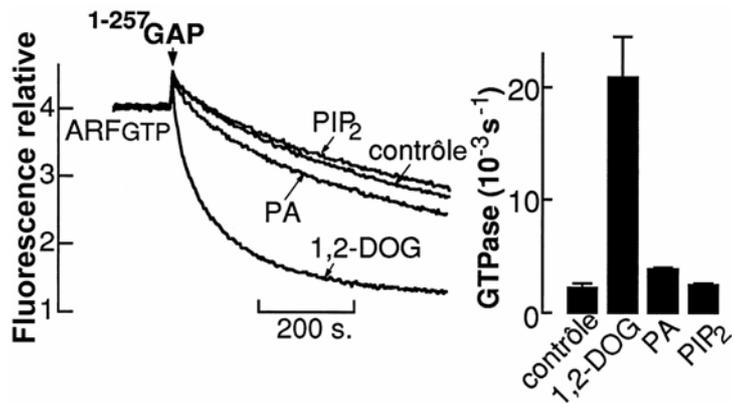


Figure 48 : Le lipide 1,2-DOG stimule l'activité d'ArfGAP1 (Antonny et al., 1997b). Arf1-GTP est ancré sur des liposomes contenant 60-65% PC, 30% PS, et lorsqu'ils sont indiqués, 5% de PIP₂, 10% de PA ou 10% de 1,2-DOG. La fluorescence intrinsèque des tryptophanes d'Arf1 est observée. Lorsque le GTP est lié, la fluorescence d'Arf1 est plus élevée. (Ce type d'expérience est détaillé dans le chapitre consacré aux méthodes expérimentales). L'hydrolyse du GTP d'Arf1 par ArfGAP1 [1-257] est 10 fois plus rapide en présence de 1,2-DOG.

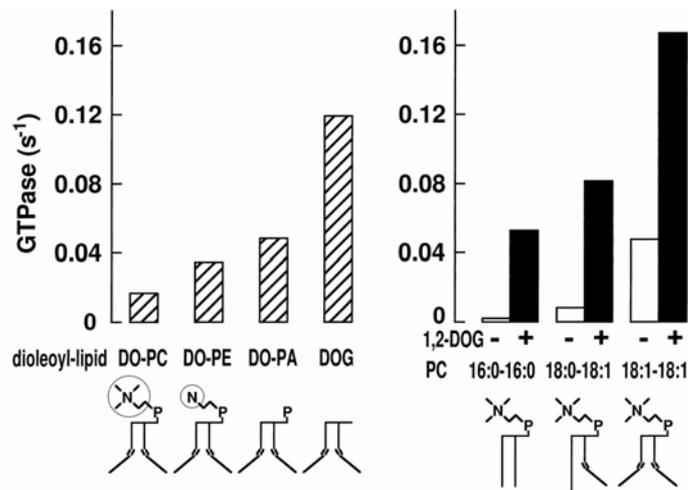


Figure 49 : Effet de la forme géométrique des lipides sur l'activité d'hydrolyse du GTP d'Arf1 par ArfGAP1 (Antonny et al., 1997b). Les liposomes utilisés comportent 30-40% PC, 30% PE, 30% PS et 10% du lipide indiqué. La forme très conique du 1,2-DOG faciliterait l'insertion de résidus hydrophobes d'ArfGAP1 dans la membrane.

c) Le DOG : La première venue des lipides pour réguler ArfGAP1

Des expériences réalisées dans notre laboratoire à la fin des années 90, portant sur l'hydrolyse du GTP d'Arf1 par ArfGAP1 en présence de liposomes, ont mis en évidence l'importance de la composition lipidique de la membrane dans cette réaction. En effet, la réaction d'hydrolyse semblait 50 fois plus lente lorsque des liposomes PC/PS étaient utilisés à la place de vésicules lipidiques d'azolectine (Antonny, 1999). Dans le chapitre précédent nous avons vu que la protéine Arf1, dans son état actif, est fermement attachée à la membrane par son hélice amphipathique et son ancre lipidique. Cette liaison, qui repose essentiellement sur des interactions hydrophobes, et en moindre mesure sur des interactions électrostatiques, n'a rien de spécifique (Antonny et al., 1997a). Par ailleurs, Schekman et son équipe ont reconstitué l'assemblage du manteau COPI sur des liposomes neutres, contenant uniquement du PC et du PE (Spang et al., 1998). Par déduction, la composition lipidique de la membrane n'est pas contraignante pour Arf1 au cours de la réaction d'hydrolyse, mais pourrait l'être pour le catalyseur de cette réaction : ArfGAP1 (Antonny et al., 1997b).

En effet, les premières observations indiquent clairement que le fragment 1-257 d'ArfGAP1 se lie directement aux membranes, et en particulier sur celles qui sont riches en 1,2-DOG (1,2-dioleoylglycérol), un lipide électriquement neutre, sans tête polaire et contenant deux chaînes grasses monoinsaturées (di-C18:1) (figure 48). De plus, l'activité d'hydrolyse d'ArfGAP1 sur Arf1 membranaire est 10 fois plus élevée si les liposomes utilisés contiennent ce type de lipide, suggérant une corrélation entre la liaison membranaire d'ArfGAP1 et son activité. Cependant, la spécificité à l'égard du 1,2-DOG a rapidement été écartée car ArfGAP1[1-257] est aussi bien activé par le 1,3-DOG. D'autre part, l'activité de la GAP est très sensible à l'état de saturation des chaînes grasses des DAGs, avec une préférence remarquable pour ceux qui possèdent au moins une chaîne monoinsaturée. Ces indications suggèrent curieusement que les propriétés 'physiques' des lipides de la membrane sont importantes dans cette liaison. Effectivement, un lipide très conique, comme le DOG avec ses chaînes grasses volumineuses, favorise la liaison membranaire et l'action d'ArfGAP1 sur Arf1, alors qu'au contraire un lipide cylindrique voire conique inversé, avec une large tête polaire et des chaînes saturées, inhibe l'activité d'ArfGAP1 (figure 49). En résumé, au lieu de reconnaître un lipide spécifiquement, ArfGAP1 profiterait probablement des 'microcavités' de la membrane, induites par la forme très conique du DOG, pour y insérer profondément ses acides aminés hydrophobes. Par ailleurs, la protéine de levure Gcs1p analogue à ArfGAP1 chez la levure montre les mêmes propriétés, indiquant que ce mode de liaison membranaire

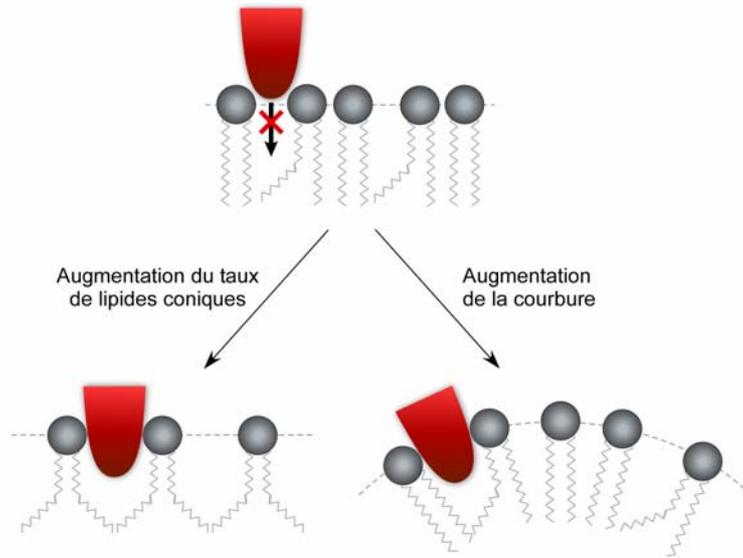


Figure 50 : Deux possibilités pour amplifier l'espace entre les têtes polaires des lipides. L'augmentation du taux de lipides coniques crée des 'microcavités' dans la membrane par espacement des têtes polaires. L'augmentation de la courbure membranaire permet aussi d'écartier les têtes polaires des lipides, mais cette fois, en maintenant une composition lipidique constante. La protéine ArfGAP1, dont une partie est ici représentée en rouge, profite de ces espacements pour interagir de manière hydrophobe avec la membrane.

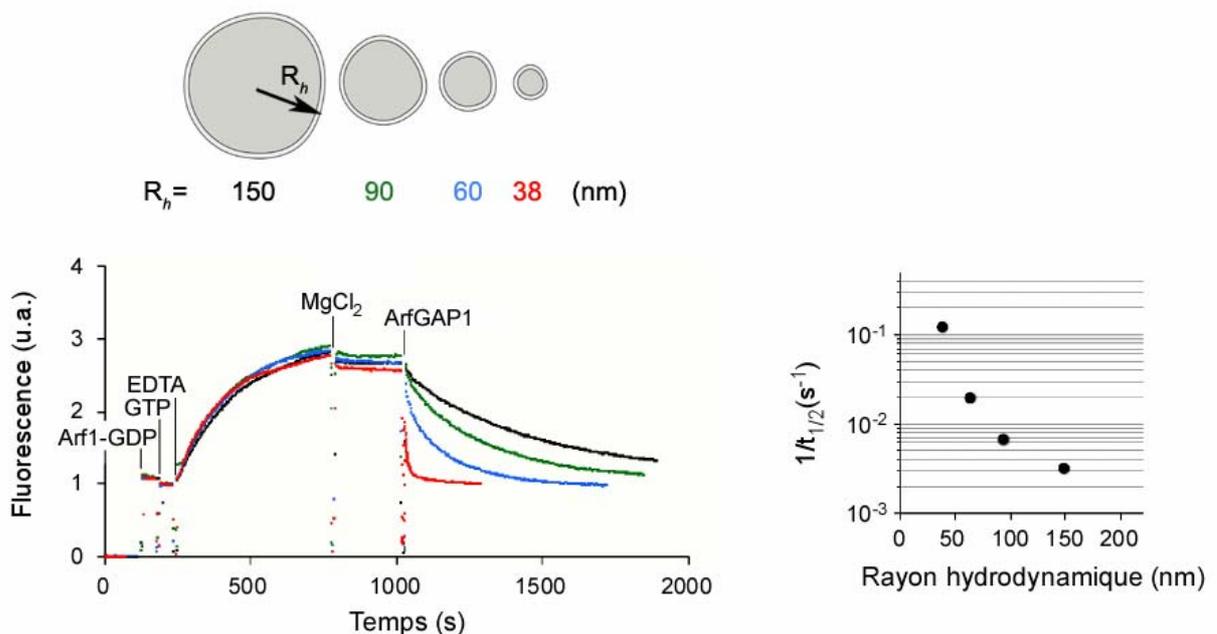


Figure 51 : L'activité d'ArfGAP1 est hypersensible à la courbure membranaire (Bigay et al., 2003). Les liposomes utilisés dans cette expérience diffèrent par leur taille mais sont tous constitués de lipides PC (50%), PE (19%), PS (5%), PI (10%) et cholestérol (16%). Le cycle GDP/GTP d'Arf1 est observé en fluorescence des tryptophanes. La vitesse d'hydrolyse du GTP d'Arf1 membranaire augmente de deux ordres de grandeur lorsque la taille des liposomes diminue.

est conservé dans l'évolution (Antonny et al., 1997b; Wong et al., 2005; Yanagisawa et al., 2002). En revanche, savoir si les DAGs jouent un rôle 'physiologique' sur l'activation d'ArfGAP1 est difficile à entreprendre. En effet, le métabolisme lipidique golgien des DAGs est complexe, car de multiples voies conduisent à leur formation. Toutefois, notons qu'une étude récente montre qu'un traitement visant à inhiber la production de DAGs prive également les membranes golgiennes de 50% d'ArfGAP1 (Fernandez-Ulibarri et al., 2007).

d) L'activité d'ArfGAP1 dépend de la courbure membranaire

La liaison membranaire et donc l'activité d'ArfGAP1 sont effectivement régulées localement par la composition lipidique de la membrane, mais ce qui relie un 'signal' DAG présumé et la formation d'une vésicule COPI reste toutefois insaisissable. Si le désassemblage du manteau survient lors de l'hydrolyse du GTP d'Arf1 en GDP, réaction catalysée par ArfGAP1, une question persiste cependant : Quand se produit exactement cette dissociation ? Quel processus régule spatialement et temporellement l'activité d'ArfGAP1 pour que le bourgeonnement et la formation d'une vésicule soient effectifs ?

Des travaux réalisés dans notre laboratoire ont établi qu'une bonne liaison membranaire d'ArfGAP1, obtenue en utilisant des lipides qui disposent de petites têtes polaires et des chaînes grasses volumineuses de type oléate, et donc faiblement compactés, peut également être atteinte en accentuant le degré de courbure de la membrane tout en maintenant sa composition lipidique constante (Bigay et al., 2003). En effet, la courbure membranaire introduit les mêmes perturbations physiques dans la membrane que la richesse en lipides coniques : L'espacement entre les têtes polaires des lipides est amplifié (figure 50). Des expériences utilisant plusieurs conditions de liposomes, dont seul le rayon varie sur une gamme allant de 150 nm à 38 nm, afin de mimer différents degrés de courbure membranaire, indiquent que l'activité d'hydrolyse d'ArfGAP1 sur Arf1-GTP membranaire est dramatiquement exacerbée par cette courbure : L'inactivation d'Arf1 est beaucoup plus rapide sur des petits liposomes (ayant une forte courbure membranaire) que sur des gros (ayant une faible courbure membranaire) (figure 51). De façon importante, ces expériences se prêtent parfaitement au contexte du manteau COPI. En effet, il existe un lien obligatoire entre la courbure membranaire et la formation d'une vésicule par le manteau, puisque sa polymérisation impose une déformation sphérique de la membrane, qui crée de la courbure et donc des espacements entre les lipides sur le feuillet externe de la membrane. Ces travaux montrent par ailleurs que la vitesse de désassemblage du manteau COPI est accélérée plus de

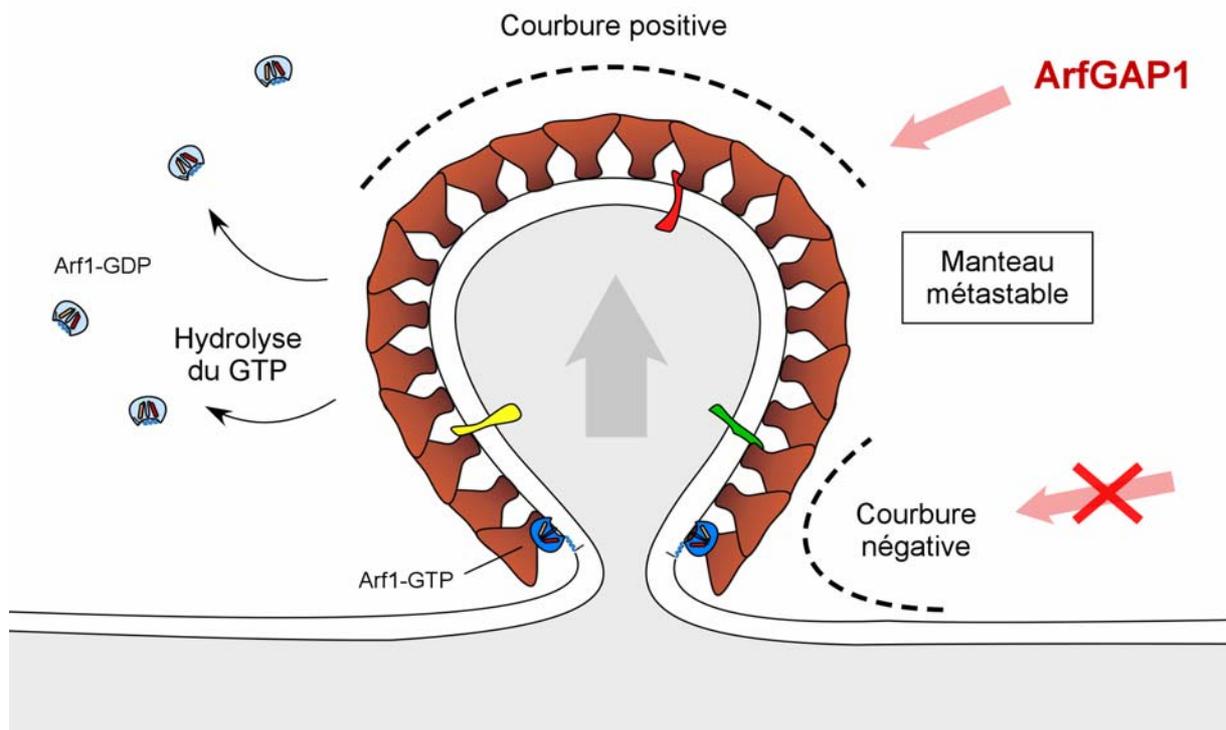


Figure 52 : Régulation dynamique d'un polymère dans l'espace par ArfGAP1. ArfGAP1 hydrolyse le GTP des protéines Arf1 sur le bourgeon vésiculaire en formation, sauf à sa base, où une courbure négative existe. De ce fait, un anneau d'Arf1-GTP au niveau du 'cou' du bourgeon maintiendrait le manteau COPI dans un état métastable jusqu'à la fission membranaire.

100 fois lorsque la courbure membranaire des liposomes utilisés approche celle des vésicules de transport golgien. D'autre part, le complexe tripartite, constitué du coatomer, d'Arf1-GDP en présence d'AlF_x et d'ArfGAP1, mimant l'état intermédiaire de l'hydrolyse du GTP, n'est stabilisé qu'à la surface de petits liposomes (Bigay et al., 2003). Ceci suggère que la machinerie catalytique d'ArfGAP1 n'est opérationnelle que lorsque cette protéine est correctement insérée dans la membrane, c'est-à-dire quand celle-ci offre suffisamment de courbure. En résumé, la courbure induite par l'assemblage du manteau COPI conduit finalement à son propre désassemblage. Cette boucle de rétroaction négative repose sur la remarquable sensibilité d'ArfGAP1 à la courbure membranaire, qui régule spatialement et temporellement son activité d'hydrolyse du GTP d'Arf1 sur le bourgeon recouvert de manteau COPI.

D'un point de vue dynamique, pendant la croissance d'un bourgeon membranaire, forcée mécaniquement par le manteau, ArfGAP1 viendrait progressivement hydrolyser le GTP des molécules d'Arf1 situées sur la vésicule en formation, sans jamais atteindre celles de la base du bourgeon, car protégées par une courbure membranaire négative (figure 52). De ce fait, un anneau d'Arf1-GTP pourrait maintenir le manteau polymérisé dans un état métastable à la surface du bourgeon, jusqu'à la libération de la vésicule dans le cytosol. De façon intéressante, ce modèle est appuyé par plusieurs études qui évoquent une dissociation d'Arf1 de la membrane plus rapide que le désassemblage du manteau sous l'action d'ArfGAP1 (Presley et al., 2002; Yang et al., 2002). Ainsi, la protéine ArfGAP1 est unique pour deux raisons qui sont d'une certaine manière liées : Premièrement, elle possède un pouvoir de liaison aux lipides tout à fait particulier, ensuite elle a la capacité de réguler un polymère dynamique dans l'espace. Il existe d'ailleurs un parallèle tout à fait remarquable entre la dynamique du manteau COPI et celle des microtubules (Antonny, 2002; Lippincott-Schwartz and Liu, 2003). En effet, les processus de polymérisation et de dépolymérisation d'un microtubule sont gouvernés par la conformation GTP/GDP de ses sous-unités de base : la tubuline. Paradoxalement, si seules les tubulines liées au GTP s'assemblent à l'extrémité d'un microtubule, celui-ci n'est pratiquement composé que de tubuline-GDP. En fait, les sous-unités de tubuline-GTP agissent comme des GAPs sur les sous-unités précédemment associées sur le microtubule. Ainsi, ce mécanisme astreint spatialement l'hydrolyse du GTP, veillant à maintenir le polymère dans un état métastable, où toutes les sous-unités GDP sont séquestrées, protégées du désassemblage par un dernier anneau de tubuline sous la forme GTP. Par comparaison, on ne s'attend pas à un désassemblage du manteau COPI immédiat, suite à l'hydrolyse localisée du GTP d'Arf1 par ArfGAP1.

e) Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre que l'hydrolyse du GTP d'Arf doit obligatoirement être catalysée par une protéine GAP, car son activité GTPase intrinsèque est presque nulle. S'il existe plusieurs familles d'Arf GAP intervenant à divers endroits de la cellule, la protéine ArfGAP1 localisée dans le Golgi contrôle le désassemblage du manteau protéique COPI. La régulation spatio-temporelle de ce processus semble fondamentale, d'une part afin d'éviter une dissociation membranaire précoce du coatomer, et d'autre part pour assurer la capture de protéines cargos à transporter. Certaines études mettent en évidence le rôle direct de cargos dans la régulation de l'activité d'ArfGAP1. En effet, en interagissant avec le coatomer ou avec ArfGAP1, ils freineraient la réaction d'hydrolyse, ce qui augmenterait la probabilité de capture d'autres cargos dans la vésicule en formation. Toutefois, cela suppose qu'un type particulier de cargo 'inhibiteur' soit présent dans chaque vésicule qui se crée à la surface du Golgi, ensuite il manque dans ce cas le régulateur 'positif' qui renverse la tendance lorsque la vésicule est formée, afin d'accélérer la réaction d'hydrolyse et permettre le désassemblage du manteau. Les travaux réalisés dans notre laboratoire ont établi un modèle original, basé sur la liaison membranaire surprenante d'ArfGAP1. En révélant que l'activité d'ArfGAP1 est hypersensible à la courbure membranaire, ces expériences ont démontré que cette protéine est capable de réguler de manière spatio-temporelle l'état du manteau COPI, en couplant son désassemblage à la courbure membranaire qu'il a lui-même induite.

ArfGAP1 possède la fonctionnalité singulière de sentir la courbure membranaire. Ce type d'interaction protéine/membrane repose vraisemblablement sur un mécanisme nouveau. L'objet du chapitre suivant, qui inclut la majeure partie de mon travail de thèse, est de répondre à la question suivante : Comment reconnaître la courbure d'une membrane ?

CHAPITRE VI :

LA RECONNAISSANCE DE LA COURBURE MEMBRANAIRE

La reconnaissance de la courbure membranaire

1) Préambule

Nous partions d'une protéine, ArfGAP1, dont l'activité est hypersensible à la courbure membranaire. Cette caractéristique surprenante n'avait été qu'entrevue sur certaines protéines auparavant, et jamais assortie d'un mécanisme moléculaire (Davies et al., 2001; Hubner et al., 1998). C'est pourquoi nous n'avons aucune idée du mécanisme associé à la reconnaissance de la courbure par ArfGAP1. La seule indication que nous possédions venait des études menées précédemment indiquant qu'ArfGAP1 est sensible non seulement à la courbure, mais également à la taille des têtes polaires des lipides, comme au taux d'insaturation de leurs chaînes grasses, c'est-à-dire à l'espacement entre les lipides (Antonny et al., 1997b; Bigay et al., 2003).

A l'exception d'une étude qui venait de paraître sur la découverte des domaines BAR, réalisée par l'équipe de McMahon (Peter et al., 2004), la littérature sur la reconnaissance de la courbure membranaire était pratiquement vierge à l'époque. Je reviendrai d'ailleurs sur ces domaines BAR dans la discussion de ce manuscrit. Par conséquent, je vais présenter directement mon travail de thèse effectué sur ArfGAP1, dont le but a été d'abord de caractériser la région d'ArfGAP1 susceptible de reconnaître la membrane à travers sa courbure, pour ensuite répondre à cette question capitale : Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans cette interaction ?

Mais en premier lieu, je désire expliquer certaines méthodes expérimentales spécifiques à nos études.

2) Méthodes

1. Comment faire des liposomes ?

Travailler sur une protéine comme ArfGAP1, qui est hypersensible à la courbure membranaire, demande premièrement de maîtriser l'environnement lipidique. Nous utilisons au laboratoire des vésicules lipidiques unilamellaires de taille homogène (ou liposomes), créées par la méthode d'extrusion sur filtre de polycarbonate. Les lipides sont d'abord mélangés dans une petite fiole en verre en forme de poire, selon un rapport souhaité, dans un solvant organique tel que le chloroforme. Par exemple, un mélange fréquemment utilisé pour

des expériences avec le manteau COPI sur des liposomes est le suivant (en mol%) : PC, 50 ; PE, 19 ; PS, 5 ; PI, 10 ; cholestérol, 16. Ce mélange lipidique est appelé ‘Golgi-mix’, car il est proche de la composition lipidique retrouvée dans l’appareil de Golgi. Ces lipides proviennent de sources naturelles, par conséquent, la longueur et le taux d’insaturation de leurs chaînes grasses sont variables. Toutefois, dans certaines expériences, ces lipides sont remplacés par des lipides synthétiques, dont la chimie des chaînes grasses est définie, comme par exemple un dioleoyl (DO)-lipide (C18:1-C18:1), ou palmitoyl-oleoyl (PO)-lipide (C16:1-C18:0). L’évaporation du solvant produit un film lipidique sec, qui est ensuite repris par agitation dans un tampon aqueux. Une suspension de larges vésicules multilamellaires (ou MLVs ; *multilamellar vesicles*), hétérogènes en taille est alors obtenue. Ce tampon aqueux ‘remplit’ l’intérieur des vésicules et doit en l’occurrence être isosmotique avec le tampon utilisé lors des futures expériences. D’autre part, on évite de mettre des ions divalents (tel que le $MgCl_2$) dans ce tampon de préparation pour ne pas favoriser la fusion des liposomes à long terme. La suspension subit ensuite cinq cycles de congélation (dans l’azote liquide) et de décongélation (à 40°C), afin de rompre les membranes lipidiques pour réduire le nombre de lamelles des liposomes. Cette préparation peut être stockée à -20°C, ou être immédiatement extrudée.

Une vingtaine d’extrusions à travers un filtre de polycarbonate, dont la taille des pores est calibrée (par exemple d’un diamètre de 0,4 μm), est nécessaire pour obtenir une population de liposomes (ou SUVs ; *small unilamellar vesicles*) de taille homogène ($R_h \approx 150$ nm). Pour cela nous utilisons un petit extrudeur manuel qui permet d’appliquer une forte pression mécanique (supérieure à 5 bars) sur la suspension ; ceci conduit les liposomes à passer de force à travers les pores, et donc à se fragmenter en liposomes plus petits et plus unilamellaires. Si l’on s’intéresse à la courbure membranaire, des liposomes de différents diamètres sont requis. L’extrusion est alors répétée avec des filtres dont le diamètre des pores diminue : 0,2 ; 0,1 ; 0,05 ; 0,03 μm , qui nous procurent des liposomes dont les rayons hydrodynamiques s’étalent de 120 à 30 nm. Les liposomes obtenus sont stockés à température ambiante sous argon, et sont utilisés dans les 48 heures.

Une méthode alternative à l’extrusion, et qui est utilisée pour obtenir des liposomes de très petite taille, est la sonication. La suspension multilamellaire de vésicules est ici soumise à des ultrasons d’une fréquence de 20kHz, générés par une sonde en titane introduite dans la solution. Ces ultrasons déclenchent la formation de milliers de bulles microscopiques qui, en explosant violemment, libèrent une énergie considérable. Les larges vésicules sont brisées pour donner naissance à une population homogène de tout petits liposomes, ayant un rayon

moyen de 20 à 25 nm. Ensuite, les débris de titane provenant de la sonde après la sonication sont éliminés par ultracentrifugation.

2. Comment déterminer la taille des vésicules ou d'autres macromolécules ?

La distribution de taille des liposomes est déterminée par diffusion quasi-élastique de la lumière (ou DLS : Dynamic light scattering). Cette méthode hydrodynamique permet de mesurer la vitesse de diffusion de particules dans un solvant. L'appareil (DynaPro) utilisé pour ce type de mesure fournit un rayon hydrodynamique, défini comme le rayon d'une sphère théorique qui diffuse dans le solvant à la même vitesse que la particule étudiée. Frappées par les molécules de solvant, les macromolécules sont animées par un mouvement Brownien. Ce mouvement de diffusion est inversement proportionnel à la surface de friction de la molécule étudiée :

$$D = kT/f = kT/6\pi\vartheta R_h$$

Où D est la constante de diffusion, T est la température, et f le coefficient de friction. Ce coefficient dépend de la viscosité du solvant (ϑ) et de la dimension de l'objet étudié (R_h), qui peut se traduire par son rayon apparent ou hydrodynamique. En d'autres termes, une grosse molécule diffuse moins dans le solvant qu'une petite molécule. L'appareil calcule des fonctions d'autocorrélation qui quantifient les fluctuations d'intensité de diffusion de lumière émise par les particules en solution entre chaque mesure. Nous mesurons séquentiellement dix fonctions d'autocorrélation, à partir desquelles une distribution de taille des liposomes est déterminée.

En plus d'être parfaitement adapté pour mesurer la taille des liposomes, cet outil offre la possibilité de contrôler l'état d'agrégation de nos protéines suite à leur purification, ou encore de suivre l'assemblage de complexes protéiques.

3. Comment suivre le changement conformationnel d'Arf1 ?

Le changement conformationnel d'Arf1 intervient au niveau de ses deux régions switch et de son interswitch, lorsque son nucléotide lié GDP est échangé par un GTP, ou alternativement lorsque ce dernier est hydrolysé en GDP. Cette bascule structurale s'accompagne d'un changement de fluorescence intrinsèque de la protéine. En fait, ces régions d'Arf1 portent deux résidus tryptophane conservés, qui jouent ici le rôle de sondes

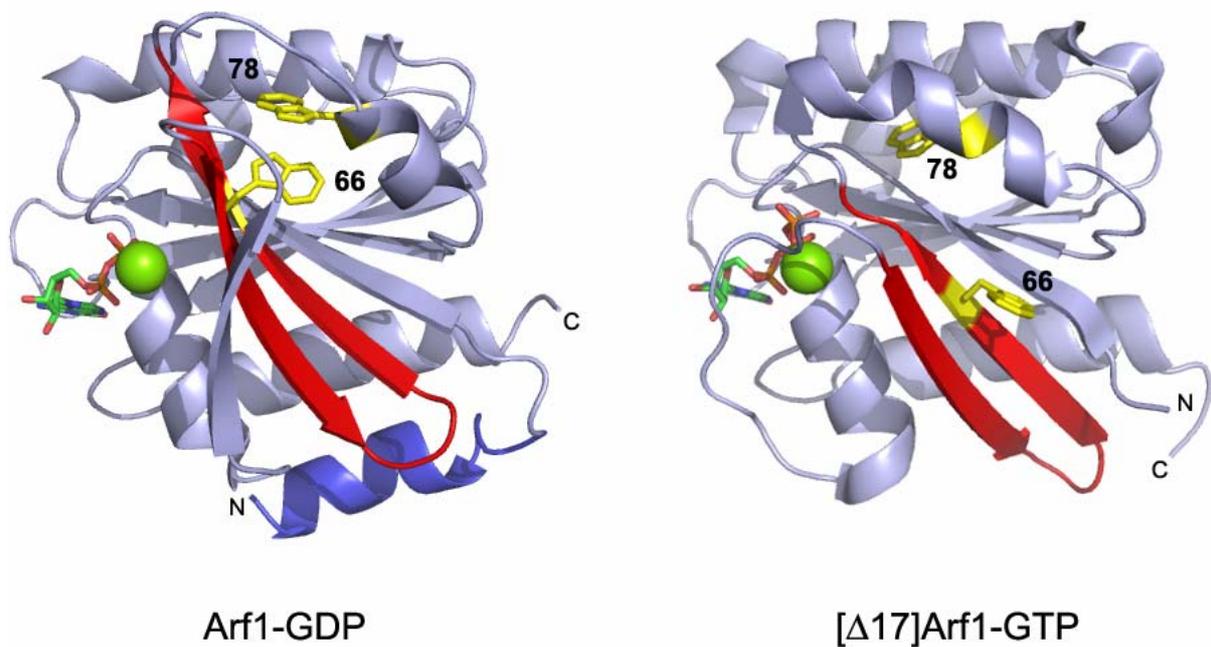


Figure 53 : Deux résidus tryptophanes jouent le rôle de sondes fluorescentes intrinsèques de l'état conformationnel d'Arf1. Les tryptophanes 78 et 66 sont proches l'un de l'autre dans la conformation GDP d'Arf1, entraînant une extinction mutuelle de leur fluorescence (*quenching*). Le déplacement du tryptophane 66 par rapport au tryptophane 78, lorsqu'Arf1 passe à l'état GTP, révèle de façon spectaculaire leur fluorescence. (Structures : Amor et al., 1994 ; Shiba et al., 2003).

fluorescentes intrinsèques de l'état conformationnel de la protéine. En effet, le déplacement du tryptophane 66 par rapport au tryptophane 78 est à l'origine de l'augmentation (de +200%) de la fluorescence d'Arf1 lorsque son GDP est remplacé par un GTP (figure 53). Le bruit de fond apporté par la diffusion de lumière des liposomes (en utilisant des concentrations allant même jusqu'à 1 mM) est minime dans ces conditions, c'est donc un très bon moyen pour suivre en temps réel le cycle d'activation et de désactivation de cette petite protéine G.

Pour suivre la fluorescence des tryptophanes, nous utilisons un spectrofluorimètre standard (Shimadzu RF5301). Les meilleurs signaux sont obtenus en utilisant une cuve en quartz cylindrique de 600 μ l équipée d'un petit barreau magnétique qui permet de mélanger l'échantillon de manière continue pendant la mesure. Alternativement, pour utiliser moins de protéines, nous pouvons travailler dans une petite cuve rectangulaire de 100 μ l, où le mélange est réalisé de façon manuelle. La fluorescence des tryptophanes est mesurée à 340 nm, avec une bande passante large (10 nm) pour accroître le signal. L'échantillon est excité à 297,5 nm avec une fine bande passante (1,5 nm) pour éviter trop de perte de fluorescence par blanchiment (*photobleaching*). Du fait de la grande amplitude de signal de fluorescence d'Arf1, nous pouvons mesurer avec précision les cinétiques d'échange GDP/GTP ou d'hydrolyse du GTP d'Arf1.

Une technique efficace pour activer Arf1 sans l'aide d'une protéine GEF est d'utiliser un chélateur d'ions divalents comme l'EDTA, pour diminuer la concentration de Mg^{2+} disponible (1 μ M Mg^{2+}). Le nucléotide GDP d'Arf1 alors déstabilisé, quitte le site nucléotidique au profit du GTP mis en excès dans la solution. L'augmentation de fluorescence d'Arf1 est suivie directement sur l'écran, et lorsque toutes les molécules d'Arf1 ont été activées, un excès de Mg^{2+} est ajouté (1 mM Mg^{2+}). Une protéine comme ArfGAP1 peut ensuite être ajoutée si l'on veut étudier l'hydrolyse du GTP d'Arf1.

4. Comment suivre l'assemblage et le désassemblage du manteau COPI ?

L'index de réfraction d'un liposome augmente lorsqu'un manteau protéique s'assemble à sa surface ; ceci augmente aussi l'intensité de la diffusion de lumière émise par le liposome. Une stratégie intéressante pour suivre l'assemblage et le désassemblage d'un manteau sur des vésicules consiste à mesurer la diffusion de lumière au moyen d'un spectrofluorimètre classique, en réglant l'appareil sur les mêmes longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. L'assemblage du manteau COPI sur des liposomes entraîne une forte augmentation d'intensité de diffusion. Il est donc possible de suivre précisément les cinétiques d'assemblage du

manteau, et de sa dissociation par l'ajout de protéines GAP d'Arf1. Les monochromateurs d'excitation et d'émission sont ici réglés sur 350 nm, avec des fines bandes passantes de 1,5 ou 3 nm.

5. Comment mesurer la liaison d'une protéine sur une membrane ?

La méthode la plus couramment utilisée pour étudier l'interaction d'une protéine avec une membrane est la sédimentation. Cette technique consiste à créer des vésicules lipidiques denses car chargées d'une solution de sucrose. Ces liposomes, d'abord mélangés avec les protéines désirées dans un tampon aqueux, sont ensuite facilement séparés du mélange réactionnel par ultracentrifugation, du fait de leur densité élevée. En comparant la quantité de protéines présentes dans le culot et dans le surnageant, nous pouvons déterminer l'avidité de telle protéine pour tels liposomes de composition lipidique définie. Toutefois, cette technique possède le désavantage de collecter certaines protéines qui n'interagissent pas avec les liposomes, mais ayant précipité. D'autre part, la sédimentation n'est pas adaptée à l'utilisation de tout petits liposomes, qui possèdent une vitesse de sédimentation trop faible. Travailler avec des liposomes de tailles variables, et notamment de petites tailles, pour appréhender le problème de la courbure membranaire, demande une technique plus appropriée.

La flottaison permet d'étudier l'effet de la courbure membranaire sur la liaison d'une protéine. Cette expérience repose aussi sur une centrifugation ; en revanche la force de flottabilité excède dans ce cas la force de sédimentation, car les liposomes ne contiennent pas de sucrose mais sont mélangés avec les protéines dans une solution dense de sucrose. Les protéines sont d'abord incubées avec des liposomes contenant une sonde lipidique fluorescente (le NBD-PE, incorporé à 0,2 mol% dans le mélange lipidique initial). Ensuite, cette suspension est ajustée à 30% (masse/volume) de sucrose dans un volume total de 250 μ l. Ce mélange est recouvert d'une couche de 200 μ l de sucrose à 25%, et d'une dernière couche de 100 μ l de tampon sans sucrose. Les tubes sont centrifugés 1 heure à 240000 g sur un rotor à balancier. Une photographie des tubes avant et après centrifugation est réalisée avec un système d'imagerie à fluorescence (Fujifilm LAS-3000), pour s'assurer de la bonne flottaison des liposomes. Ensuite, trois fractions sont récupérées à l'aide d'une seringue Hamilton en partant du bas : 250 μ l (fond, 'Bottom'), 150 μ l (milieu, 'Middle'), et finalement 100 μ l (sommet, 'Top') où sont attendus les liposomes. La fluorescence de chaque fraction prélevée est contrôlée pour s'assurer de la bonne récupération des liposomes dans la fraction attendue

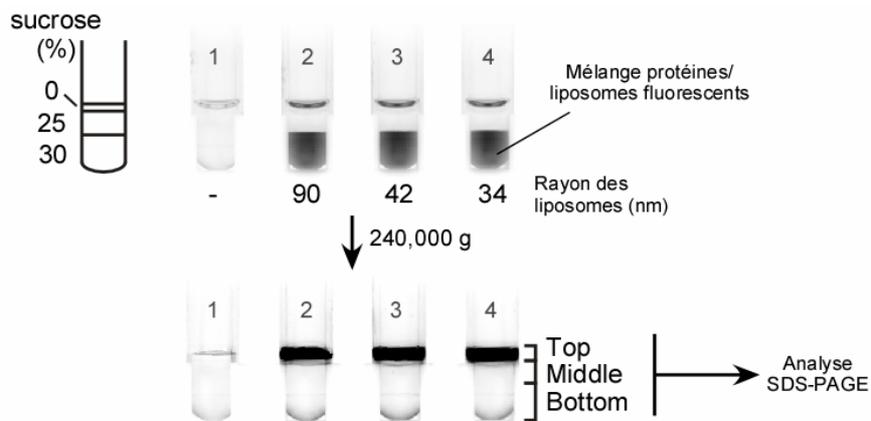


Figure 54 : Expérience de flottaison. Les liposomes sont visualisés par la fluorescence du lipide NBD-PE.

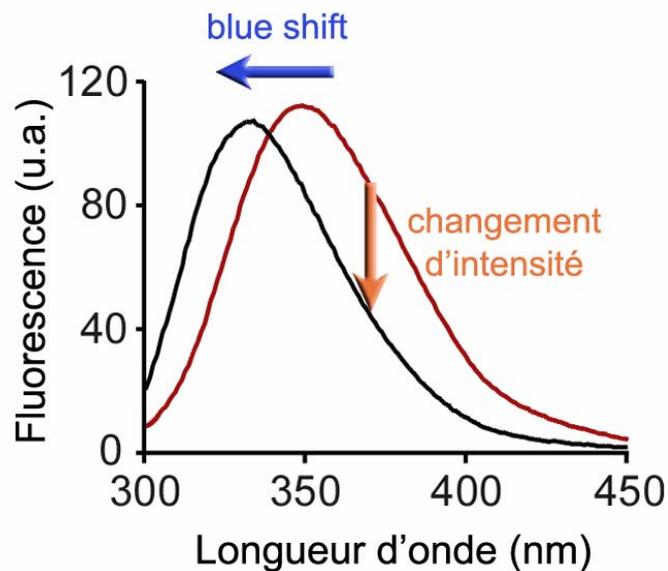


Figure 55 : Spectres d'émission de fluorescence des tryptophanes, après excitation à 280 nm. Lorsqu'un résidu tryptophane passe d'un environnement polaire à un environnement apolaire (par exemple s'il passe d'un milieu aqueux à un milieu membranaire), le pic de son spectre d'émission se décale vers des longueurs d'onde plus courtes (décalage dans le bleu ou *blue shift*). Le changement d'intensité de fluorescence à une longueur d'onde donnée, apporte une information quantitative sur l'avidité du résidu tryptophane pour la membrane étudiée.

(figure 54). Les fractions sont ensuite déposées sur gel SDS-PAGE pour voir leur contenu protéique. Alternativement nous ne déposons que les fractions 'Top' sur gel.

Cette méthode est efficace pour évaluer l'avidité de protéines sur des liposomes de rayons variés, et donc de déterminer si une protéine est capable de sentir la courbure membranaire. Toutefois, cette méthode n'offre qu'une fenêtre assez étroite pour quantifier l'interaction entre une protéine et une membrane lipidique. Plus particulièrement, elle ne permet pas de comparer des liaisons membranaires fortes. Or, une mesure quantitative de l'affinité de deux protéines, qui paraissent avoir une partition membranaire apparemment 'totale' sur gel, peut donner des résultats très différents.

Pour aborder des mesures de liaison membranaire plus quantitatives, nous utilisons la fluorescence des tryptophanes. En effet, il s'avère que lorsque la protéine ou le peptide porte un résidu tryptophane correctement positionné, sa fluorescence est un outil analytique puissant. Toutefois, les liposomes utilisés dans ce type d'expérience doivent être assez petits, car ils diffusent fortement la lumière UV, et pourraient gêner le signal de fluorescence. C'est pourquoi nous préférons travailler ici avec des liposomes soniqués. Le changement d'environnement que subit un résidu tryptophane lorsqu'il bascule d'un milieu aqueux à un environnement apolaire, suite à la liaison du peptide sur la membrane, modifie son émission de fluorescence intrinsèque. Qualitativement, ce changement de fluorescence se traduit par un léger décalage du pic du spectre d'émission (mesuré entre 300 et 450 nm) vers une longueur d'onde plus courte ; ce phénomène est appelé '*blue shift*' (figure 55). Quantitativement, l'intensité de la fluorescence émise, mesurée à une longueur d'onde donnée, diminue (ou augmente selon le cas) en fonction de la concentration en lipides. La longueur d'onde d'émission choisie est généralement celle qui offre les meilleures variations d'intensité. Concrètement, les tryptophanes d'un peptide sont excités à 280 nm (avec 3 nm de bande passante), et la diminution du signal d'émission (mesuré par exemple à 370 nm, avec une bande passante large de 15 nm) est observée à chaque incrément (injection) de liposomes soniqués. Nous réalisons ce type d'expérience dans une cuve cylindrique de 600 μ l, continuellement agitée par un barreau magnétique. Au fil des incréments de liposomes, le signal de fluorescence prend l'allure typique d'un 'escalier' descendant, qui donne une première estimation visuelle de la dose-réponse (figure 56). Toutefois, plusieurs corrections doivent être apportées, dans la mesure où les liposomes ajoutés diffusent la lumière et diluent l'échantillon. Deux expériences contrôles sont alors réalisées pour corriger ces deux paramètres : Elles consistent à reproduire la même expérience d'incrément de liposomes

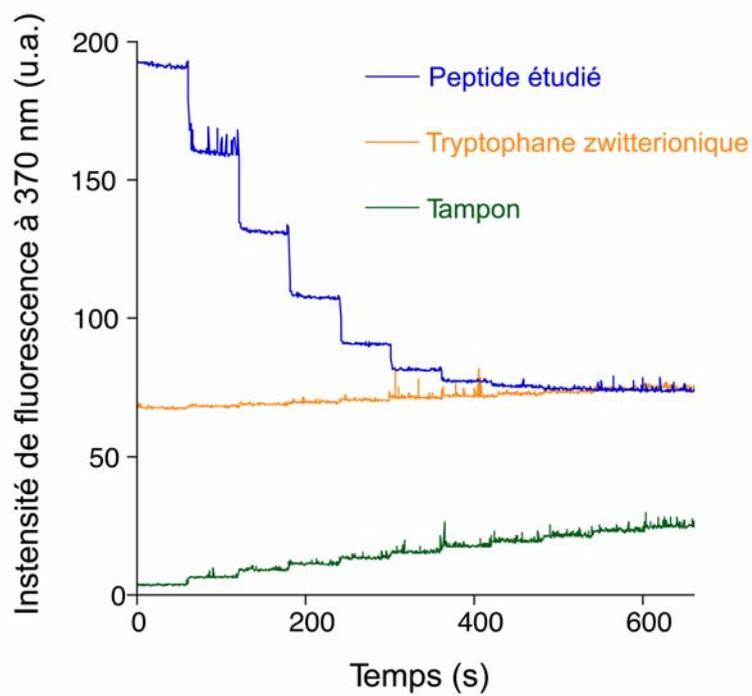


Figure 56 : Signal d'émission de fluorescence à 370 nm (données brutes). Les tryptophanes sont excités à 280 nm. Les liposomes sont incrémentés toutes les minutes dans une solution contenant soit le peptide étudié, soit du tryptophane zwitterionique, soit du tampon seul.

que précédemment, mais sur du tampon seulement (**a**), et sur une solution de tryptophanes zwitterioniques restant solubles (**b**).

La fluorescence spécifique correspond à l'intensité de fluorescence mesurée du peptide, corrigée du signal de diffusion établi grâce au contrôle **a**, et d'un facteur de dilution calculé à partir des intensités de fluorescence mesurées lors du contrôle **b**, elles-mêmes corrigées du signal de diffusion. Notons F_i , L_i et W_i les intensités de fluorescence, mesurées après i incréments de liposomes, dans les expériences avec le peptide, le tampon et le tryptophane soluble respectivement. Notons k_i le facteur de dilution. Le changement de fluorescence spécifique dû à la liaison aux liposomes correspond donc à :

$$\Delta F_{(spé)i} = (F_i - L_i)/k_i - F_0$$

où $k_i = (W_i - L_i)/W_0$

donc $\Delta F_{(spé)i} = (F_i - L_i)[W_0/(W_i - L_i)] - F_0$

Ce changement de fluorescence est proportionnel à la quantité de peptide lié aux liposomes : $\Delta F_{(spé)i} = f[P_m]$; $[P_m]$ étant la concentration de peptide lié. De ce fait, nous pouvons déduire de la courbe de dose-réponse la constante réactionnelle de partition membranaire d'un peptide. Cette constante de partition K_p indique la concentration de lipides exposée au solvant pour laquelle 50% du peptide étudié est lié.

La fluorescence intrinsèque des tryptophanes est une méthode particulièrement efficace pour étudier quantitativement la partition membranaire d'un peptide. Toutefois, cette technique est limitée à l'utilisation de très petits liposomes, car ils diffusent la lumière ultraviolette trop fortement s'il sont plus gros. Or, s'intéresser aux phénomènes liés à la courbure membranaire demande de travailler avec des liposomes de tailles variées. Pour cela, nous utilisons des sondes fluorescentes extrinsèques telles que le NBD. Comme le tryptophane, le NBD montre un 'blue-shift' de son pic d'émission lorsqu'il bascule d'un environnement polaire à un environnement apolaire, mais il absorbe et émet la lumière dans le spectre visible, où la diffusion de lumière causée par les liposomes est plutôt faible. Le marquage NBD sur un peptide se fait par liaison covalente sur un résidu cystéine à partir de IANBD amide. Le groupement thiol de la cystéine attaque l'IANBD amide, qui perd un iodométhane suite à la substitution nucléophile. La réaction est stoppée par du DTT. Lors des expériences de fluorescence, le peptide marqué en présence (ou non) de liposomes dans une

cuve de 100 μ l est excité à 505 nm (bande passante de 5 nm), et son spectre d'émission est mesuré entre 520 et 680 nm (bande passante de 5 nm). Plus le peptide se lie aux liposomes, plus l'intensité du pic d'émission augmente. Un spectre contrôle est réalisé sans peptide pour corriger la diffusion de lumière due aux liposomes.

6. Comment déterminer la structure secondaire d'une protéine ?

La spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD pour *circular dichroism*) est l'outil clé pour déterminer rapidement la structure secondaire d'une protéine ou d'un peptide. Ces macromolécules sont chirales et donc 'optiquement actives', c'est-à-dire qu'elles ont la propriété d'absorber différemment les lumières polarisées circulaires droite et gauche. A la sortie du milieu mesuré, les deux lumières polarisées circulaires sont d'amplitudes inégales, ce qui produit une lumière polarisée elliptique. Grâce à des polariseurs, le spectromètre mesure l'ellipticité, c'est-à-dire l'angle correspondant à la forme de la lumière polarisée elliptique. L'ellipticité varie selon le pouvoir rotatoire de la structure des molécules étudiées, qui lui-même dépend de la longueur d'onde de la lumière émise. Concrètement, l'allure d'un spectre CD, dans une gamme de longueurs d'onde de l'UV lointain (typiquement entre 190 et 260 nm), dépend de l'organisation locale des liaisons peptidiques. De ce fait, il indique la proportion de la protéine dans les conformations en hélice α , feuillet β , coudes et structures aléatoires (*random coil*). De manière intéressante, le CD nous donne la possibilité de suivre les modifications de conformations d'une protéine, comme son repliement, en présence d'autres agents chimiques (par exemple les liposomes). Si le dichroïsme circulaire offre moins d'informations sur la structure des protéines que la diffractométrie de rayon X ou la RMN, il permet de faire des mesures rapides, et surtout d'étudier la dynamique moléculaire dans des conditions d'analyse variées.

Les mesures de CD sont réalisées dans des cuves en quartz dont le trajet optique est très fin (de 0,05 cm), en utilisant des solutions tampons qui absorbent peu l'UV lointain. Par ailleurs, l'appareil est rempli d'azote pour évacuer tout l'air dont l'oxygène absorbe fortement dans cette gamme de longueurs d'onde. L'absorbance à 280 nm des protéines et peptides utilisés dans les expériences de CD est mesurée préalablement afin de déterminer leur concentration. Si nous voulons mesurer l'effet de liposomes sur la structure secondaire d'une protéine, nous procédons par incréments, comme pour certaines mesures de fluorescence. Finalement, les spectres CD sont corrigés de l'absorbance non spécifique du tampon utilisé, ainsi que du bruit de fond occasionné par les liposomes.

3) Résultats

a) Identification d'un motif senseur de courbure membranaire : ALPS

A part le domaine GAP N-terminal d'ArfGAP1, structuré autour d'un doigt de zinc, cette protéine n'a pas d'autre domaine reconnaissable dans le reste de ses 415 acides aminés. Donc, afin d'identifier une région protéique qui reconnaît cet état membranaire particulier, nous avons profité de la similitude de séquence importante entre ArfGAP1 et Gcs1p, la protéine homologue la plus proche d'ArfGAP1 dans la levure. De façon intéressante, la similitude entre ces deux protéines s'étend au-delà de leur domaine catalytique et comprend notamment une région centrale d'une cinquantaine de résidus (figure 1, article 1). Nous avons d'abord montré que Gcs1p possède une activité d'hydrolyse du GTP d'Arf1 dépendante de la courbure membranaire comme ArfGAP1, et que ces deux protéines se lient préférentiellement sur des petits liposomes ($R_h \approx 30$ nm) dont la membrane est courbée, plutôt que sur des gros liposomes ($R_h \approx 90$ nm), ayant une membrane plus plane. Ensuite, par un jeu de mutagenèse sur la protéine ArfGAP1, nous avons découvert qu'une courte région qui s'étend entre les résidus 192 et 257, conservée chez Gcs1p, est suffisante pour reconnaître les membranes fortement courbées. Nous avons appelé ce motif « ALPS », pour *ArfGAP1 Lipid Packing Sensor*.

Nous nous sommes alors intéressé au mécanisme d'interaction de ce motif avec la membrane courbée. De façon importante, le motif ALPS est très hydrophobe, pauvre en résidu chargé, et riche en sérine et thréonine (figure 1, article 1). Nos expériences ont indiqué, comme attendu, que ce motif interagit avec la membrane de manière hydrophobe uniquement, sans être influencé par la charge des têtes polaires lipidiques. D'autre part, des résidus hydrophobes conservés (F214, W211, L207) sont cruciaux pour la liaison et l'activité d'ArfGAP1 (figure 4, article 1). Deux alternatives étaient alors envisageables : Soit ces résidus s'insèrent dans la membrane par interaction directe, soit ils permettent le repliement du motif ALPS en un domaine structuré. Toutefois, plusieurs observations, et notamment la forte susceptibilité d'ArfGAP1 à la protéolyse ménagée, ont indiqué que cette protéine est essentiellement non structurée en solution. De ce fait, la présence d'un domaine replié de reconnaissance lipidique dans la séquence d'ArfGAP1 nous a semblé peu probable. L'hypothèse d'une interaction directe entre les résidus hydrophobes et la membrane a été confirmée par des expériences de protéolyse ménagée en présence de liposomes de différentes

tailles. De façon importante, nous avons montré que les petits liposomes protègent ArfGAP1 de la coupure par la chymotrypsine après le résidu aromatique Y208, suggérant que celui-ci est enfoui dans la membrane (figure 5, article 1).

La répartition des résidus hydrophobes et des résidus polaires dans la séquence du motif ALPS, tous les 3 à 4 résidus, nous suggérait une structure en hélice amphipathique. Toutefois, tous les programmes de prédiction de structures secondaires indiquaient que la présence d'une hélice à cet endroit était ambiguë. En effet, par sa pauvreté en résidus chargés et son taux important en résidus glycines, le motif ALPS n'est pas prédisposé à se structurer en hélice α . Nous avons alors postulé que le motif ALPS serait non structuré en solution, mais qu'il se replierait en hélice amphipathique seulement à la surface de membranes courbées. Pour le vérifier, nous avons réalisé des expériences de dichroïsme circulaire en présence et en absence de petits liposomes (figure 6, article 1). Nous avons révélé que le motif ALPS subit un changement de conformation saisissant, en basculant d'un état non replié en solution en une hélice α amphipathique au contact de petits liposomes. Cette hélice amphipathique dont la face apolaire est riche en gros résidus hydrophobes, possède la particularité d'avoir une face polaire extrêmement riche en résidus hydroxylés sérines et thréonines, contrairement aux hélices amphipathiques classiques qui portent généralement de nombreux résidus chargés.

Selon notre hypothèse, la reconnaissance de la courbure membranaire reposerait sur le fait que les résidus sérines et thréonines n'interagissent pas de façon électrostatique avec les têtes polaires des lipides comme le font les résidus chargés, et de ce fait ne peuvent contribuer à l'insertion de l'hélice dans la membrane. Ainsi, puisque seul le pouvoir hydrophobe est en jeu, la courbure membranaire qui écarte les têtes polaires lipidiques les unes des autres, faciliterait l'insertion des résidus hydrophobes du motif ALPS et donc la liaison d'ArfGAP1 avec la membrane.

ARTICLE 1 :

ArfGAP1 responds to membrane curvature through
the folding of a lipid packing sensor motif

**Joëlle Bigay, Jean-François Casella, Guillaume Drin,
Bruno Mesmin, Bruno Antony**

ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif

Joëlle Bigay, Jean-François Casella, Guillaume Drin, Bruno Mesmin and Bruno Antonny*

CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Sophia Antipolis, France

ArfGAP1 promotes GTP hydrolysis in Arf1, a small G protein that interacts with lipid membranes and drives the assembly of the COPI coat in a GTP-dependent manner. The activity of ArfGAP1 increases with membrane curvature, suggesting a negative feedback loop in which COPI-induced membrane deformation determines the timing and location of GTP hydrolysis within a coated bud. Here we show that a central sequence of about 40 amino acids in ArfGAP1 acts as a lipid-packing sensor. This ALPS motif (ArfGAP1 Lipid Packing Sensor) is also found in the yeast homologue Gcs1p and is necessary for coupling ArfGAP1 activity with membrane curvature. The ALPS motif binds avidly to small liposomes and shows the same hypersensitivity on liposome radius as full-length ArfGAP1. Site-directed mutagenesis, limited proteolysis and circular dichroism experiments suggest that the ALPS motif, which is unstructured in solution, inserts bulky hydrophobic residues between loosely packed lipids and forms an amphipathic helix on highly curved membranes. This helix differs from classical amphipathic helices by the abundance of serine and threonine residues on its polar face.

The EMBO Journal (2005) 24, 2244–2253. doi:10.1038/sj.emboj.7600714; Published online 9 June 2005

Subject Categories: membranes & transport

Keywords: amphipathic helix; COPI; GTPase

Introduction

Protein coats are dynamic polymers that assemble at the surface of cell membranes to form transport vesicles. Most protein coats are controlled by small G proteins of the Arf and Sar families (Kirchhausen, 2000; McMahon and Mills, 2004). In the GTP conformation, Arf and Sar proteins bind avidly to lipid membranes and recruit coat complexes such as coat-omer in the COPI coat, Sec23/24 in the COPII coat, and AP and GGA adaptors in clathrin coats. Coat complexes make additional links with the membrane, notably with short export motifs harboured by membrane proteins, and self-assemble laterally to form a curved lattice that induces bending of the underlying membrane. As a result, a network

of interactions maintains the coat in an assembled state until the vesicle pinches off.

One unresolved issue in protein coat dynamics is the timing of GTP hydrolysis. *In vitro*, GTP hydrolysis in Arf or Sar is required for coat disassembly but not for assembly (Tanigawa *et al*, 1993; Barlowe *et al*, 1994; Reinhard *et al*, 2003). *In vivo* however, protein coats may lose most Arf or Sar molecules through GTP hydrolysis before disassembly. Indeed, clathrin- and COPII-coated vesicles isolated with GTP contain low amounts of Arf and Sar, respectively (Barlowe *et al*, 1994; Zhu *et al*, 1998). One possibility is that the lateral interactions between the polymerized coat proteins and their binding to other membrane components compensate for the loss of Arf-GTP or Sar-GTP. This compensation should be easier within lattice interior, where the network of lateral interactions is complete, than at the coat edge, where new coat proteins assemble. In analogy with microtubules (Desai and Mitchison, 1997), we suggested that the GTP hydrolysis reaction may be spatially organized so as to keep enough Arf/Sar-GTP at the edge of the coat (Antonny and Schekman, 2001).

Several mechanisms could cooperate to restrict the spatial distribution of Arf/Sar-GTP to the edge of a coated membrane area. In the COPII coat, the guanine nucleotide exchange factor Sec12 is excluded from the coat, thus providing new Sar-GTP molecules only at the coat periphery, whereas fast GTP hydrolysis requires Sar1 to be trapped by all COPII units (Antonny *et al*, 2001; Futai *et al*, 2004). As a result, the probability of having Sar1-GTP should decrease from the edge to the centre of the coat. In the COPI coat, for which similar mechanisms may apply, we have described an additional mechanism that should prevent GTP hydrolysis at the edge of a coated bud, while accelerating it in the interior. This mechanism lies on the remarkable sensitivity of ArfGAP1, a GTPase-activating protein for Arf1, to membrane curvature (Bigay *et al*, 2003).

ArfGAP1 is a Golgi-localized protein that controls the dynamics of the COPI coat (Cukierman *et al*, 1995; Liu *et al*, 2005). ArfGAP1 is the founder member of the ArfGAP family (Donaldson, 2000; Randazzo and Hirsch, 2004). These proteins are characterized by a Zn-finger domain of about 120 amino acids (aa), which promotes GTP hydrolysis in Arf (Goldberg, 1999; Mandiyan *et al*, 1999). Since Arf-GTP is attached to lipid membranes, the targeting of ArfGAPs to membranes is crucial for their function. Some ArfGAP proteins contain structural domains (e.g. PH domains) that bind to specific lipids such as phosphoinositides (Donaldson, 2000; Randazzo and Hirsch, 2004). In ArfGAP1 however, the Zn-finger GAP domain (aa 10–130) is the only recognizable domain in the full 415 aa sequence. Moreover, although the binding of ArfGAP1 to model lipid membranes and its activity towards Arf1-GTP are remarkably sensitive to lipid composition, no specific ArfGAP1–lipid interaction seems to be involved (Antonny *et al*, 1997b). Instead, it seems that the key parameter governing the adsorption of

*Corresponding author. CNRS, Institut de Pharmacologie, Moléculaire et Cellulaire, 660 route des Lucioles, 06560 Valbonne-Sophia Antipolis, France. Tel.: +33 4 93 95 77 75; Fax: +33 4 93 95 77 10; E-mail: antonny@ipmc.cnrs.fr

Received: 5 April 2005; accepted: 23 May 2005; published online: 9 June 2005

shown in Figure 1B and C, the time course of Arf1 inactivation initiated by the addition of Gcs1p was very sensitive to liposome radius. As previously observed for rat ArfGAP1 (Bigay *et al*, 2003), a 100-fold increase in the apparent activity of Gcs1p was observed when the liposome radius was reduced from 140 to 30 nm, with a very sharp effect at radii below 50 nm. Gcs1p had weaker activity than ArfGAP1, an effect that we attributed to the use of mammalian Arf1 as a substrate (Figure 1C). Interestingly, the sensitivity of Gcs1p to liposome radius was shifted to higher radii with liposomes containing unsaturated lipids (C18:1–C18:1) as compared to liposomes made from natural sources (Figure 1C). Yeast cells are known to contain more unsaturated lipids than mammalian cells and Gcs1p could be adapted to this feature.

ArfGAP1 and Gcs1p bind preferentially to small liposomes

To quantify in a direct manner the avidity of ArfGAP1 and Gcs1p for curved lipid membranes, we used a flotation assay, in which liposomes and associated proteins were recovered by centrifugation at the top of dense sucrose cushions (Figure 2). We found this method more reliable than sedimentation, as the efficiency of liposome recovery by sedimentation diminished as the size of the liposomes decreased. Proteins were incubated with liposomes of defined radii at a

protein:lipid molar ratio of about 1:1000. A control experiment was performed in the absence of liposomes. The suspension was adjusted to 30% w/v with sucrose, overlaid with two cushions of lower density and then centrifuged in a swing rotor for 1 h at 240 000g. The liposomes contained 0.2 mol% of the fluorescent lipid nitrobenzoxadiazoldihexadecanoyl-phosphatidylethanolamine (NBD-PE) and could be visualized in the tubes before and after centrifugation using a fluorescence imaging system (Figure 2A). Whatever their size, the liposomes moved almost completely from the high-sucrose cushion to the sucrose-free cushion as a result of centrifugation. We typically collected 80–90% of the lipids in the top 100 μ l. The protein content of the various fractions was determined by SDS–PAGE. As shown in Figure 2B, the binding of ArfGAP1 to liposomes strongly increased with membrane curvature. Thus, if only 14% of ArfGAP1 was found associated with large liposomes (Rh = 88 nm), 98% was found associated with small liposomes (Rh = 31 nm). Gcs1p bound also in a radius-dependent manner to C18:1–C18:1 Golgi-mix liposomes (Figure 2C). Altogether, the results of the GTPase and flotation assays suggested that ArfGAP1 and Gcs1p contain a region that binds avidly to highly curved lipid membranes.

The central region of ArfGAP1 is necessary and sufficient for binding to curved lipid membranes

We constructed several truncated forms of ArfGAP1 in which the central homology region with Gcs1p has been either conserved or deleted (Figure 3A). The [1–257], [1–196], [1–148] and [137–257] constructs contained an N-terminal poly-histidine tag and were purified from bacteria inclusion bodies by nickel chromatography under denaturing conditions. After renaturation by dialysis, proteins were further purified by anion exchange or gel filtration chromatography (Figure 3B). As determined by analytical gel filtration on a Superose-12 column, these constructs displayed an apparent molecular weight within once and twice the calculated molecular weight, suggesting no significant residual aggregation (Figure 3C). In addition, we constructed two protein fusions in which aa 192–257 or 192–231 of ArfGAP1 were added to GST (Figure 3A and B). The sensitivity of the various constructs to membrane curvature was assessed by the flotation assay and, for those containing the GAP domain, by the fluorescence GAP assay.

The largest construct, [1–257]ArfGAP1, which contains the homology region with Gcs1p, showed strong sensitivity to liposome radius. [1–257]ArfGAP1 bound avidly to small liposomes but not to large liposomes (Figure 3D) and its activity on liposome-bound Arf1-GTP strongly increased with membrane curvature (Figure 3E). Therefore, [1–257]ArfGAP1 behaved essentially as full-length ArfGAP1 with regard to its interaction with liposomes. In marked contrast, shorter constructs ending at aa 196 or 148 did not associate to liposomes, even at low liposome radius, and were almost insensitive to liposome radius in the GTPase assay (Figure 3D and E). Because all constructs displayed comparable background GAP activity in solution on a soluble form of Arf1 ([Δ 17]Arf1-GTP; data not shown), we concluded that the central region of ArfGAP1 (within aa 196 and 257) is necessary for coupling GTP hydrolysis in the Arf1–ArfGAP1 complex with the curvature of the supporting lipid membrane.

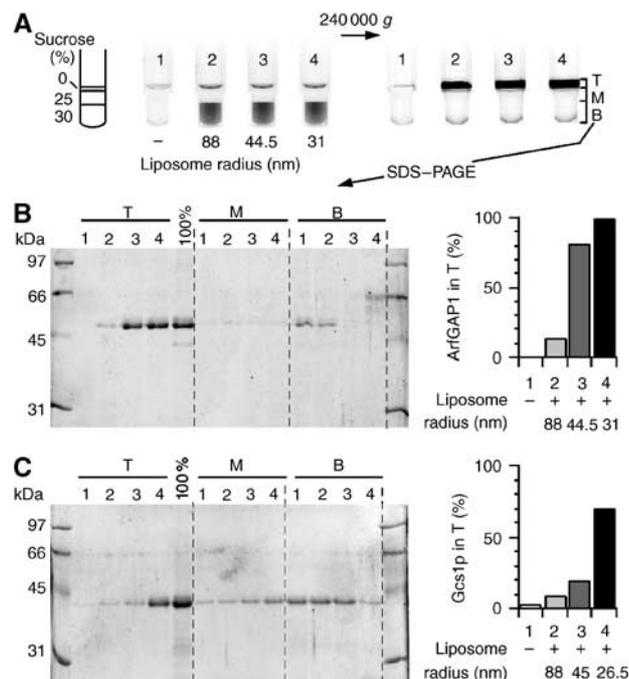


Figure 2 The binding ArfGAP1 and Gcs1p to liposomes increases with membrane curvature. (A) Flotation assay. ArfGAP1 (0.75 μ M) was incubated with Golgi-mix liposomes (0.75 mM lipids) of decreasing size (tubes 2–4) or with no liposome (tube 1). The suspension was adjusted to 30% w/v sucrose and overlaid with two cushions of decreasing sucrose density. The NBD fluorescence of the liposomes was visualized in the tubes before and after centrifugation using a fluorescence imaging system. NBD fluorescence appears as black. (B) After centrifugation, the top (T), middle (M) and bottom (B) fractions were collected and analysed by SDS–PAGE. Proteins were stained with sypro-orange. The 100% lane was used to determine the ratio of ArfGAP1 present in the top fraction (right panel). (C) Same analysis with Gcs1p using C18:1–C18:1 Golgi-mix liposomes.

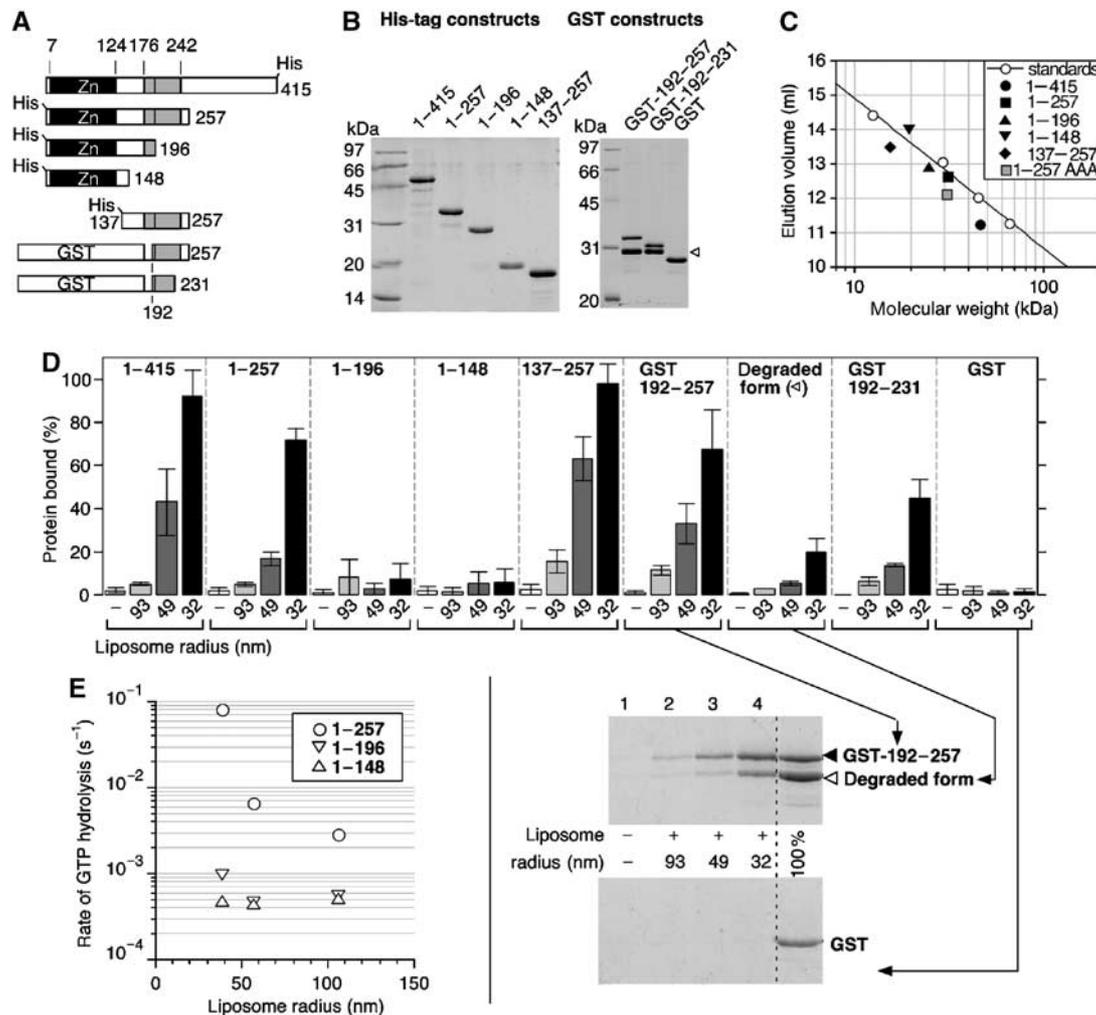


Figure 3 The central region of ArfGAP1 is necessary and sufficient to sense membrane curvature. (A) Diagram of the various constructs. (B) SDS-PAGE of the purified proteins visualized with sypro-orange. Note the presence of a degradation product in the GST constructs (white arrow). This form probably corresponds to a GST-192-214 fusion form as assessed by HPLC and mass spectrometry analysis (see Materials and methods). (C) Size-exclusion chromatography of the constructs with a polyhistidine tag on a superose-12 column. The straight line represents the best fit for the elution of molecular weight standards. The grey square (1-257AAA) represents the elution peak of [1-257]ArfGAP1 carrying the triple L207A-W211A-F214A mutation. (D) Avidity of the various constructs for Golgi-mix liposomes of decreasing size. For all constructs, flotation experiments similar to that described in Figure 2 were conducted except that the protein concentration was 1 μ M and the lipid concentration 0.5 mM. The error bars show the variation observed between two independent experiments using different batches of liposomes. A detail view of the SDS-PAGE is shown for some GST constructs. (E) GAP assay using Arf-GTP bound to Golgi-mix liposomes of defined size. ArfGAP1[1-148] and ArfGAP1[1-196] were used at 100 nM. ArfGAP1[1-257] was used at 50 nM.

The central region of ArfGAP1 is not only necessary but also sufficient for interacting with highly curved lipid membrane. This was demonstrated by the fate of three constructs in the flotation assay. [137-257]ArfGAP1 as well as GST-[192-257]ArfGAP1 and GST-[192-231]ArfGAP1 bound in a radius-dependent manner to Golgi-mix liposomes, whereas pure GST did not bind at all (Figure 3D). The largest construct, [137-257]ArfGAP1, bound more avidly than the GST constructs but the recovery of GST-[192-231]ArfGAP1 with small liposomes remained substantial. Interestingly, the two GST fusions contained a degraded form that displayed residual avidity for small liposomes. As assessed by mass spectroscopy analysis, this form would correspond to the fusion of GST with the 192-214 sequence of ArfGAP1.

In conclusion, the mapping experiments presented in Figure 3 demonstrate that the region of ArfGAP1 that binds to highly curved lipid membranes is a motif of about 40 aa (between aa 192 and 231). This motif will be referred here as

ALPS (for ArfGAP1 Lipid Packing Sensor). The ALPS motif is highly hydrophobic, rich in serine and threonine residues and overlaps the homology region with Gcs1p (see Figure 1A).

The ALPS motif recognizes highly curved membranes through hydrophobic interactions

We previously suggested that ArfGAP1 recognized packing defects between lipid molecules due to the mismatch between the actual curvature of the lipid membrane and the molecular shape of the various lipids (Antonny *et al*, 1997b; Bigay *et al*, 2003). This hypothesis was based on the observation that ArfGAP1 is sensitive not only to the liposome radius but also to the ratio between conical and cylindrical lipids. At constant liposome radius, the recruitment of ArfGAP1 and Gcs1p increased when lipids with small polar heads and/or bulky acyl chains (e.g. dioleoyl-glycerol) were introduced at the expense of cylindrical lipids (e.g. dipalmitoyl-PC) (Antonny *et al*, 1997b). Therefore, a straightforward

model would be that ArfGAP1 inserts hydrophobic residues between loosely packed lipids.

To determine if hydrophobic interactions indeed contribute to the recognition of curved lipid membranes by the ALPS motif, we compared the binding of [137–257]ArfGAP1 to neutral or anionic liposomes of decreasing radius. Figure 4A shows that [137–257]ArfGAP1 bound in a radius-dependent manner to pure PC liposomes and that the introduction of the anionic lipid phosphatidylserine (PS) had no effect on its avidity for liposomes. Moreover, the recruitment of [137–257]ArfGAP1 increased when palmitoyl-oleoyl lipids were replaced by di-oleoyl lipids. We concluded from these experiments that the interaction of the ALPS motif with the lipid bilayer is essentially hydrophobic and is driven by the increase in lipid spacing that occurs when membrane curvature or the ratio between conical and cylindrical lipids increases.

Conserved hydrophobic residues in the ALPS motif contribute to the recognition of curved membranes

Among the most conserved residues of the ALPS motif are several hydrophobic residues (Figure 1A). We postulated that these residues could sense defects in lipid packing induced by membrane curvature. Three of these residues, L207, W211 and F214, were mutated individually or in combination into alanine. The mutations were introduced in the [1–257]ArfGAP1 construct as this form could be easily expressed in *Escherichia coli* and could be used both in the flotation assay and in the GAP assay.

The L207A, W211A and F214A mutations had drastic effects on the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. Figure 4B shows the time course of Arf1 inactivation initiated by the addition of the various [1–257]ArfGAP1 mutants when Arf1-GTP was prebound to small liposomes (black traces) or large liposomes (grey traces). For the wild-type form of [1–257]ArfGAP1, decreasing the liposome radius from 92 to 33 nm increased the rate of Arf inactivation 25-fold. Under the same conditions, a five-fold increase was observed for the L207A and F214A mutants. The W211A mutation had an even more severe effect as it almost abolished the sensitivity of [1–257]ArfGAP1 to liposome curvature (Figure 4B). The results of the flotation assay agreed qualitatively with what was observed in GAP assay. The W211A mutation reduced more strongly the avidity of [1–257]ArfGAP1 for liposomes than the L207A and F214A mutations (data not shown). However, the three mutants still exhibited significant binding to liposomes, probably because the flotation assay was performed at higher lipid concentration than the GAP assay.

To confirm the importance of the L207–W211–F214 triplet in the adsorption of ArfGAP1 onto curved lipid membranes, we constructed a triple mutant in which these three hydrophobic residues were replaced simultaneously by alanine. Figure 4C shows that the triple mutant remained essentially soluble in the flotation assay even with small liposomes. This further highlights the essential contribution of L207, W211 and F214 in the recognition of curved membrane.

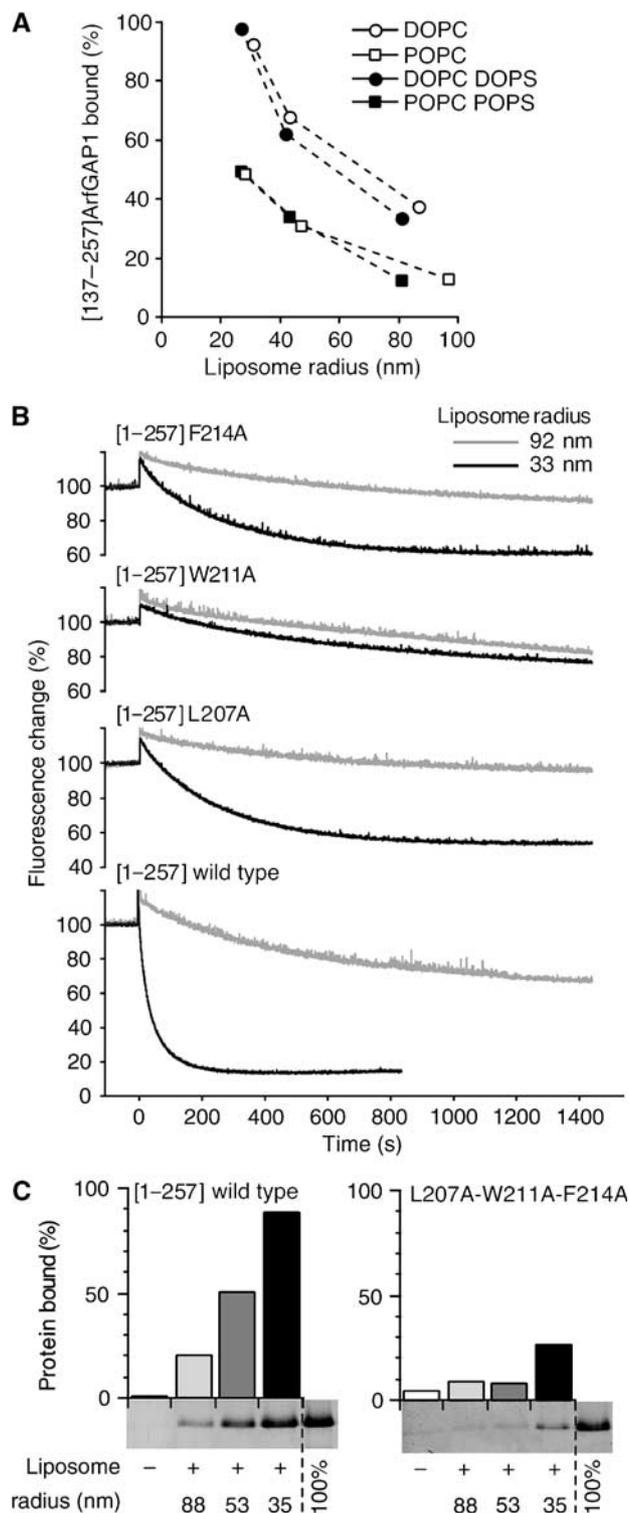


Figure 4 The interaction between the central region of ArfGAP1 and curved lipid membranes is exclusively hydrophobic. (A) Avidity of [137–257]ArfGAP1 for neutral or anionic liposomes of defined size as assessed by flotation experiments. The liposomes contained 100% DOPC (white circles), 100% POPC (white squares), 70% DOPC and 30% DOPS (black circles) or 70% POPC and 30% POPS (black squares). (B) GAP assay using Arf1-GTP bound to Golgi-mix liposomes extruded through 0.2 μ m (grey traces) or 0.03 μ m (black traces) polycarbonate filters. The hydrodynamic radius of the liposomes was 92 and 33 nm, respectively. GTP hydrolysis was initiated by the addition of 50 nM [1–257]ArfGAP1 carrying the indicated point mutations and was followed by tryptophan fluorescence. (C) Effect of the triple L207A–W211A–F214A mutation on the avidity of [1–257]ArfGAP1 for Golgi-mix liposomes of defined size. Protein concentration: 0.75 μ M; lipid concentration: 0.75 mM.

Limited proteolysis experiments

The hydrophobic residues identified above might directly contact the lipid membrane or alternatively contribute to the folding of the ALPS motif. However, we suspected that this region was actually not well structured in solution. First, we noticed that wild-type [1–257]ArfGAP1 showed longer retention on a gel filtration column as compared to the triple L207A–W211A–F214A mutant, suggesting that the three hydrophobic residues were exposed to the gel matrix (Figure 3C). Second, several constructs containing the central region of ArfGAP1 were partially degraded during protein expression and purification. This degradation was more readily observed for the small GST fusions (see Figure 3B), which were soluble in bacteria and therefore more exposed to proteolysis than the His-tagged constructs, which accumulated in inclusion bodies. The apparent molecular weight of some of the degraded forms suggested that the ALPS motif was a major site for proteolysis.

To probe the folding of the ALPS motif, we conducted limited proteolysis experiments. In agreement with previous findings (Goldberg, 1999), we observed that full-length ArfGAP1 is highly sensitive to proteolysis and that no structural domain, except the N-terminal Zn-finger GAP domain, could be inferred on the basis of resistance to proteolysis (data not shown). However, interesting observations were made using chymotrypsin, which cleaves after aromatic residues. In solution or in the presence of large liposomes, chymotrypsin cleaved [1–257]ArfGAP1 into two major fragments (Figure 5A). The largest fragment (band 1) appeared rapidly and then slowly disappeared (Figure 5A and B). As determined by Western blot and mass spectrometry, this fragment includes the N-terminal polyhistidine tag and ends at residue 208. Tyrosine 208 is right in the middle of the ALPS motif. The smallest fragment (band 2), which appeared more slowly, includes the N-terminal His tag and ends at residue F144, just after the N-terminal Zn-finger domain. Strikingly, the addition of small liposomes had no effect on cleavage at position 144 but abolished cleavage at position 208. Moreover, an additional fragment (band 3) accumulated in the presence of small liposomes with the same kinetics as band 2. This new fragment was identified as the complement of the 1–144 fragment (aa 145–257). Obviously, the 145–257 fragment could not accumulate in solution, as cleavage at position 208 precedes cleavage at position 144. In conclusion, the high susceptibility of the ALPS motif to proteolysis suggests that this region is not a structurally defined domain in solution. Yet this region is capable of interacting directly and specifically with highly curved membranes, which leads to its protection from proteolysis.

The ALPS motif becomes structured at the surface of highly curved membranes

Several hydrophobic residues of the ALPS motif are regularly spaced every three or four residues (199-FLNNA^MSSLYS^LGWSSFTTGASKFAS-223), a feature suggestive of an amphipathic α -helical structure (Figure 6B). However, the sequence contains several glycine, serine and threonine residues, which have a low propensity to form α -helices. We reasoned that the ALPS motif could be unstructured in solution but could fold as an amphipathic α -helix on curved membranes through the insertion of hydrophobic residues between loosely packed lipids.

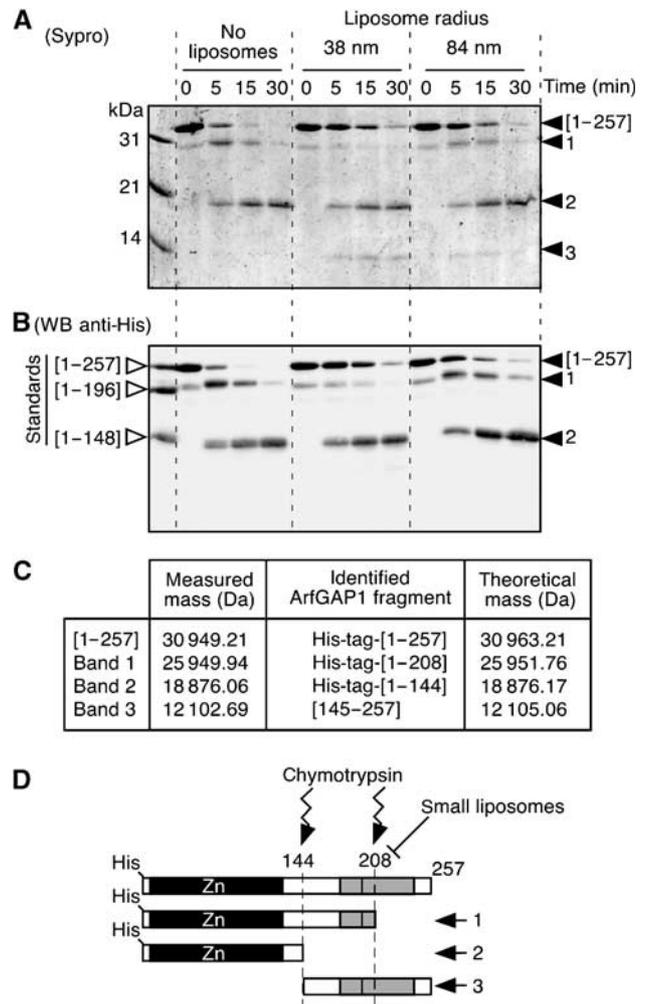


Figure 5 The central region of ArfGAP1 is highly susceptible to proteolysis in solution but is protected in the presence of small liposomes. ArfGAP1[1–257] was incubated with no liposomes, small DOPC:DOPS liposomes or large DOPC:DOPS liposomes. At time zero, chymotrypsin was added. The reaction was stopped at the indicated times and analysed by SDS–PAGE using sypro-orange staining (A) and by Western blot using an anti-polyhistidine tag antibody (B). The first line in the Western blot is a mixture of the indicated ArfGAP constructs (see Figure 3A), which were used as standards. Note that ArfGAP1[1–257] is slightly contaminated at time zero by a band that migrates between the first fragment that is generated by chymotrypsin (band 1) and the [1–196] standard. Similar results were observed with Golgi-mix liposomes. (C) Mass spectrometry analysis of the various fragments generated by chymotrypsin. (D) Schematic view of the proteolysis reaction.

To assess the effect of membrane curvature on the secondary structure of the ALPS motif, we performed far-UV circular dichroism (CD) spectroscopy. The experiments were carried out with full-length ArfGAP1 as well as with three truncated constructs: one including the Zn-finger GAP domain ([1–196]ArfGAP1) and two including the ALPS motif ([137–257]ArfGAP1 and [192–257]ArfGAP1). The [192–257]ArfGAP1 construct was a lyophilized peptide purified by HPLC and solubilized in CD buffer before measurement. Figure 6A shows that full-length ArfGAP1 and the two constructs encompassing the ALPS motif undergo a dramatic change in secondary structure upon binding to small liposomes.

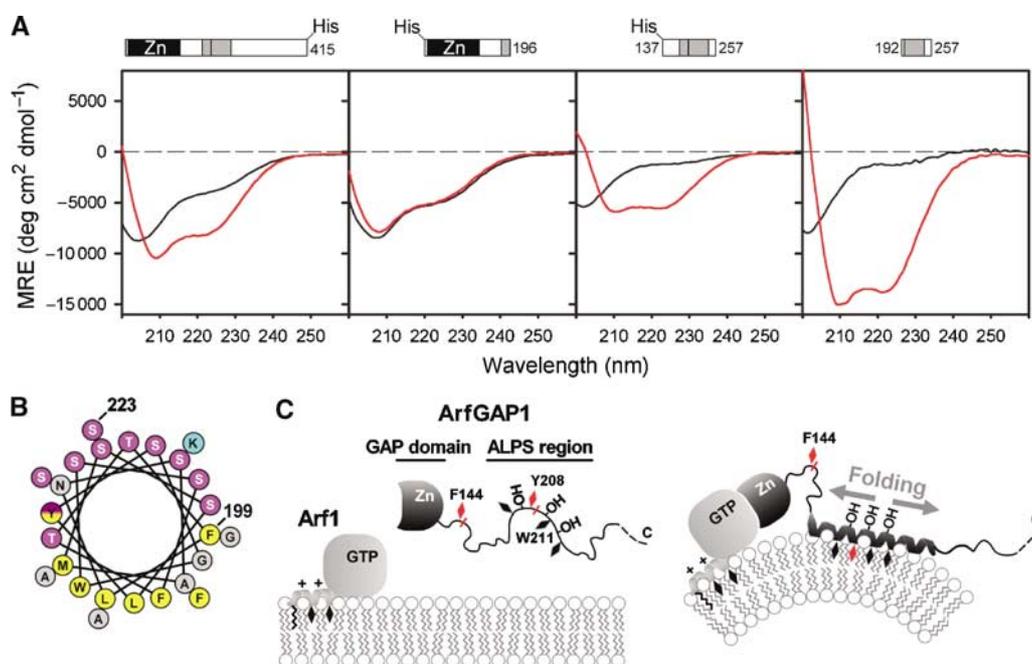


Figure 6 The ALPS motif adopts a helical structure at the surface of highly curved membrane. (A) Far-UV CD spectra of full-length ArfGAP1 and of truncated constructs in the absence (black traces) or presence (red traces) of small DOPC/DOPS liposomes (hydrodynamic radius 24–30 nm). From left to right: ArfGAP1 (8 μM) with and without 4.6 mM liposomes (lipid/protein ratio = 575); [1–196]ArfGAP1 (13 μM) with and without 3.225 mM liposomes (L/P = 250); [137–257]ArfGAP1 (30 μM) with and without 7.5 mM liposomes (L/P = 250); [192–257]ArfGAP1 (14 μM) with and without 3.125 mM liposomes (L/P = 223). (B) Helical-wheel representation of the 199–223 sequence of rat ArfGAP1. The same colour code as Figure 1 was used. The yellow–purple gradation used for tyrosine illustrates the dual character of this residue (hydrophobic and hydroxylated). (C) Schematic view of the coupled folding binding process by which the ALPS motif recognizes curved membranes. Black diamonds represent hydrophobic residues. Chymotrypsin cleavage sites are shown in red. Note that ArfGAP1 interacts also with transmembrane proteins and with coatamer, which have been omitted in this scheme for clarity.

somes. In contrast and as expected from previous experiments (Figure 3D and E), [1–196]ArfGAP1 showed no change in secondary structure. In solution, [137–257]ArfGAP1 and [192–257]ArfGAP1 do not show a well-defined secondary structure as indicated by a CD minimum at 202 nm (black traces). When incubated with a saturating amount of small liposomes, the two constructs shifted to a typical α -helical pattern with two CD minima at 210 and 222 nm (red traces). The mean residue ellipticity reached more negative values for the smallest construct, suggesting a higher percentage of α -helix. By fitting the experimental spectra, we estimated the helical content of liposome-bound [137–257]ArfGAP1 and of liposome-bound [192–257]ArfGAP1 at 20 and 48%, respectively. Considering the length of the two constructs, this indicates that 25–33 residues have adopted an α -helical structure, a number that fits well with the size of the 199–223 amphipathic sequence. The CD spectra of full-length ArfGAP1 somehow recapitulated the features of the truncated forms. In solution, ArfGAP1 showed a high content of disordered secondary structure. However, ordered secondary structures, also observed in [1–196]ArfGAP1 and which probably corresponded to the Zn-finger GAP domain, were detected. In the presence of small liposomes, the CD spectrum of full-length ArfGAP1 was clearly dominated by α -helical structures. We concluded from the CD experiments that the adsorption of ArfGAP1 to curved membranes is accompanied by a dramatic structural change and that this change is due to the folding of the ALPS motif into an α -helical structure.

Discussion

We have shown that ArfGAP1 responds to membrane curvature through the membrane adsorption and folding of a motif, which acts as an ArfGAP1 Lipid Packing Sensor (ALPS). This motif is conserved from yeast to mammals (Figure 1A) and is the hallmark of the ArfGAP1/Gcs1 subfamily. Intriguingly, ArfGAP3 and Glo3, which display redundant functions with ArfGAP1 and Gcs1, do not have this motif (Poon *et al*, 1999; Lewis *et al*, 2004; Watson *et al*, 2004). The ALPS motif includes regularly spaced hydrophobic residues, which probably insert directly between lipids provided that the membrane is sufficiently bent. This insertion is accompanied by the folding of the ALPS motif into an amphipathic helical structure. By detecting lipid-packing defects, the ALPS motif would enable tuning the rate of GTP hydrolysis in Arf1 according to the membrane deformation induced by the COPI coat (Figure 6C). The ALPS motif shows overlap with the region of ArfGAP1 (aa 203–334) that has been shown to be required for its cellular localization (Yu and Roth, 2002). Thus, the targeting of ArfGAP1 to the Golgi may involve several determinants, of which the ALPS motif may serve mostly to control the orientation of the GAP domain towards membrane-bound Arf1GTP.

The ALPS motif is centred on a tryptophan residue (W211) (Figure 1A). This residue is strictly conserved and its replacement by an alanine abolished the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature (Figure 4B). Close to W211 is Y208, which becomes protected from proteolysis as a result of

membrane binding (Figure 5), and two well-conserved hydrophobic residues, L207 and F214, which are also important for the recognition of curved membranes (Figure 4B and C). We propose that the side chain of L207, W211 and F214 (and perhaps that of neighbouring hydrophobic residues) inserts between lipids provided that the membrane is sufficiently bent. This insertion explains the strict hydrophobic character of the ArfGAP1/membrane interaction and its sensitivity to both lipid geometry and membrane curvature (Figure 4A) (Antonny *et al*, 1997b; Bigay *et al*, 2003).

CD spectroscopy demonstrates that the binding of the ALPS motif to curved lipid membranes is accompanied by its folding into an α -helical structure (Figure 6A). According to secondary-structure prediction algorithms, the 195–230 sequence of ArfGAP1 could form α -helices, but a drop in the probability is found in the middle of the sequence due to the presence of two glycines and several serines and threonines. Consequently, the propensity of this region to adopt an α -helical structure may be exquisitely sensitive to the environment. In the absence of a favourable hydrophobic surface, this region is mostly unstructured as indicated by its high susceptibility to proteolysis (Figure 5) and by its CD spectrum (Figure 6A). However, at the surface of highly curved lipid membranes where defects in lipid packing facilitate the penetration of hydrophobic residues, the ALPS region clearly adopts an α -helical structure (Figure 6A) and becomes protected from proteolysis (Figure 5).

Several proteins interact with lipid membranes through the adsorption of amphipathic α -helices, without necessarily requiring the bending of the lipid membrane. So what prevents the ALPS motif from interacting with flat membranes? We suggest that the ability of the amphipathic helix of the ALPS motif to sense membrane curvature lies on its remarkable polar face, which is composed almost exclusively of serine and threonine residues (Figure 6B). The polar face of membrane-adsorbing amphipathic helices generally contains charged residues, which contribute to membrane adsorption by making electrostatic interactions with lipid polar heads. Thus, the N-terminal amphipathic helix of epsin directly contacts the polar head of PIP₂ through its basic polar face (Ford *et al*, 2002; Stahelin *et al*, 2003). Other amphipathic helices contain positively and negatively charged residues distributed in a well-defined manner in the polar face to make electrostatic interactions with the polar head of zwitterionic lipids such as PC and phosphatidylethanolamine (PE) (Segrest *et al*, 1992; Cornell and Northwood, 2000; Ulmer *et al*, 2005). For Arf-GTP, a myristoyl group acts in concert with an N-terminal amphipathic helix to help anchor the protein at the membrane surface (Antonny *et al*, 1997a; Pasqualato *et al*, 2002). These examples illustrate that several interactions must work in concert to overcome the cost of spreading apart lipid molecules that should accompany the deep insertion of an amphipathic helix. Consequently, epsin (and perhaps Arf1-GTP) can induce curvature of an initially flat membrane (Ford *et al*, 2002; Farsad and De Camilli, 2003). In contrast, the ALPS motif can only sense membrane curvature because, except for the presence of hydrophobic residues, it has no additional feature that could help its membrane interaction. Thus, the abundance of threonines and serines may simply arise from the need of having a hydrophilic face without having charged residues that could contribute to membrane binding.

The ALPS motif does not recognize membrane curvature *per se*, that is, a curved geometry, but loose lipid packing, which is a consequence of membrane curvature. As such, the ALPS motif is very different from the BAR domain, a recently discovered structural domain that can sense and induce membrane curvature (Peter *et al*, 2004). The BAR domain consists of an elongated six-strand coiled-coil with an overall banana shape, the concave face of which is basic and therefore adapted to interact with acidic and curved lipid membranes (Peter *et al*, 2004). *In vitro*, both the BAR domain (Peter *et al*, 2004) and the ALPS motif (this study) interact preferentially with small liposomes. *In vivo* however, they may be adapted to different membrane deformations. Thus, high lipid packing should exclude the ALPS motif from the neck of a budding vesicle, whereas the complex surface geometry of such a membrane region, with a dual curvature (negative and positive), could be well adapted to the BAR domain.

From deletion mapping experiments, the boundaries of the ALPS motif are not clear-cut. If the GST-192–231 construct displays significant avidity for small liposomes, larger constructs encompassing this region bound significantly better (Figure 3D). The lack of clear boundaries is not surprising for an intrinsically unstructured region, but it will be important to determine whether the structural change that accompanies the adsorption of ArfGAP1 to curved lipid membranes is limited to the amphipathic sequence around W211 or whether it propagates beyond. ArfGAP1 interacts not only with Arf1-GTP, but also with coatamer and transmembrane proteins (Aoe *et al*, 1999; Goldberg, 1999; Lanoix *et al*, 2001; Majoul *et al*, 2001; Szafer *et al*, 2001; Rein *et al*, 2002; Yang *et al*, 2002), and a large structural change imposed by membrane curvature may have profound effect on this interaction network in the confined environment of a coated membrane bud. Also of note is the fact that many proteins that are involved in the formation of transport vesicles contain large regions that are predicted to be intrinsically unfolded. This feature is very important for the rapid and reversible formation of multiple protein/protein interactions (Dafforn and Smith, 2004). In addition, these regions may also be affected by membrane-induced folding events.

Materials and methods

Liposome preparation

Lipids in chloroform were purchased from Avanti Polar Lipids except egg PC (Sigma) and NBD-PE (Molecular Probes). Liposomes used in flotation and GAP activity experiments were produced by extrusion. A dried film was prepared by evaporation of a mixture of the indicated lipids in chloroform and resuspended in 50 mM Hepes pH 7.2 and 120 mM K-acetate. After five steps of thawing and freezing in liquid nitrogen, the liposome suspension was extruded sequentially through (pore size) 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 and 0.03 μ m polycarbonate filters using a hand extruder (Avanti) at a final lipid concentration of 1–2.5 mM. The liposome radius was estimated by DLS in a Dyna Pro instrument. Liposomes were stored at room temperature and used within 2 days after preparation. The composition of Golgi-mix liposomes was (mol%) egg PC (50), egg PE (19), brain PS (5), liver phosphatidylinositol (10), cholesterol (16) and NBD-PE (0.2). (C18:1–C18:1) Golgi-mix liposomes had the same polar head composition but were prepared with dioleoyl-PC, dioleoyl-PE and dioleoyl-PS. The small liposomes used for CD spectroscopy were obtained by sonication of DOPC:DOPS (70:30) suspension (15 mM) in 10 mM Tris pH 7.5 and 150 mM KCl with a titanium tip sonicator. Titanium and lipid debris were removed by centrifugation at 100 000g for 20 min to obtain a homogeneous

population of liposomes with an average radius of 24–30 nm (as determined by DLS on several samples).

Protein expression and purification

Full-length myristoylated Arf1 and Gcs1p were purified as described (Franco *et al*, 1995; Poon *et al*, 2001). Full-length rat ArfGAP1 with a polyhistidine tag was purified from SF9 cells (generous gift from J Premont) by MonoQ chromatography as described (Premont and Vitale, 2001).

The [1–257], [1–148], [1–196] and [137–257] fragments of rat ArfGAP1 were PCR-amplified from the pKM260 construct (Cukierman *et al*, 1995) using primers that incorporated *NdeI* and *BamHI* restriction sites and ligated into the pET16b expression vector (Novagen). This vector adds a polyhistidine tag and a cleavage site for factor X. Point mutations (L207A, W211A and F214A) were introduced in the ArfGAP1[1–257]-pET16b vector using the site-directed mutagenesis kit from Stratagene. The pET16b ArfGAP1 constructs were expressed in *E. coli* at 37°C and purified from inclusion bodies by nickel chromatography (Qiagen) under denaturing conditions as described (Huber *et al*, 2001). Renaturation was performed by gentle dialysis against a mixture of two solutions; the first contained 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 4 M guanidine, 2 mM DTT and 1 mM PMSF and was gradually replaced (overnight) by the second solution containing 25 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 50 μ M ZnCl₂, 2 mM DTT and 1 mM PMSF. Aggregated material was discarded by centrifugation. For the [1–148], [1–196] and [1–257] constructs, the supernatant was further purified by MonoQ chromatography (Amersham) using a linear 0–1 M NaCl gradient. For the [137–257] construct, the supernatant was further purified by gel filtration on a sephacryl HR 200 column (Amersham) in 50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl and 1 mM MgCl₂.

For the GST fusions, the [192–231] or [192–257] sequence of ArfGAP1 was PCR-amplified as *BamHI/EcoRI* inserts and cloned into the pGEX-2T expression vector (Roche), which includes a thrombin cleavage site. After expression, bacteria were lysed in 50 mM Tris pH 7.4 and 150 mM NaCl, supplemented with 1 mM PMSF, 1 mM pepstatin, 10 mM bestatin, 10 mM phosphoramidon and a cocktail of anti-proteases (Roche). The supernatant was incubated for 1 h with a glutathione Sepharose 4B gel (Amersham) and the beads were submitted to several washes. GST fusions were eluted in the same buffer supplemented with 10 mM glutathione. Alternatively, the beads with GST[192–257]ArfGAP1 were incubated with thrombin to allow the elution of the ArfGAP1 peptide. The thrombin eluate was further purified by HPLC on a chromolith C18 column (Merck) with an acetonitrile gradient. By mass spectrometry, we identified one HPLC peak as the [192–257]ArfGAP1 peptide and a second peak as the [192–214]ArfGAP1 peptide. The two peptides also contained the GS sequence from the thrombin cleavage site of the pGEX-2T expression vector. The [192–257]ArfGAP1 peptide was lyophilized and stored at –20°C before use.

Analytical gel exclusion chromatography

Aliquots of the various purified ArfGAP1 constructs (0.7–2 nmol in a total volume of 100 μ l) were applied to a superose 12 column and eluted at a flow rate of 0.5 ml/min in 25 mM Hepes pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1 mM DTT. The column was calibrated using the following standards: bovine serum albumin (66.0 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), carbonic anhydrase (29.0 kDa) and cytochrome c (12.4 kDa).

Tryptophan fluorescence GAP assay

Tryptophan fluorescence was measured at 340 nm (bandwidth 20 nm) upon excitation at 297.5 nm (bandwidth 3 nm) in a Shimadzu R5301 fluorimeter equipped with stirring and injection facilities. All experiments were performed at 37°C. The cylindrical quartz cuvette initially contained extruded liposomes (0.2 mM) in HKM buffer (50 mM Hepes pH 7.2, 120 mM KAc, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT). Arf1-GDP (0.5 μ M) was added and activated by the sequential addition of 40 μ M GTP and 2 mM EDTA (giving 1 μ M [Mg²⁺]_{free}). After 10 min, 2 mM MgCl₂ (giving 1 mM [Mg²⁺]_{free}) was added. GTP hydrolysis was initiated by the addition of Gcs1p, ArfGAP1 or the indicated constructs. For simplicity, the fluorescence level of Arf1-GDP was arbitrary set at zero and the fluorescence level after the GTP loading step was set at 100%. Therefore, the fluorescence scale shown in the figures directly reflects the fraction of Arf1 that undergoes GTP hydrolysis.

Flotation experiments

Proteins (0.5–1 μ M) and liposomes (0.5–1 mM) were incubated in HKM buffer at room temperature for 5 min in a total volume of 150 μ l. The suspension was adjusted to 30% sucrose by adding and mixing 100 μ l of a 75% w/v sucrose solution in HKM buffer. The resulting high-sucrose suspension was overlaid with 200 μ l HKM containing 25% w/v sucrose and 50 μ l HKM containing no sucrose. The sample was centrifuged at 55 000 r.p.m. (240 000 g) in a Beckman swing rotor (TLS 55) for 1 h. The bottom (250 μ l), middle (150 μ l) and top (50 μ l) fractions were manually collected from the bottom using a Hamilton syringe and analysed by SDS-PAGE using the fluorescent dye sypro-orange (Molecular Probes). The gels were visualized and quantified using a FUJI LAS-3000 fluorescence imaging system. We checked the recovery of the liposomes during centrifugation and after fraction collection by following NBD-PE fluorescence. A fluorescence image of the tubes before and after centrifugation was taken in the fluorescence imaging system using a small mirror at 45°, which directed the side image of the tubes to the vertically positioned CCD camera. After fraction collection, the amount of NBD in the various collected fractions was quantified using the same imaging system.

Limited proteolysis

[ArfGAP1] (0.8 μ M) was incubated in HKM buffer with or without liposomes (0.8 mM) at 25°C in a total volume of 150 μ l. At time zero, 0.08 μ g/ml chymotrypsin was added. At the times indicated, 30 μ l aliquots were withdrawn, supplemented with 0.5 mM PMSF and stored on ice. The proteolysis reaction was analysed by SDS-PAGE using sypro-orange staining and by Western blot using an anti-polyhistidine tag antibody.

Mass spectrometry

Mass measurements were made on a Perseptive Biosystems Voyager-DE PRO MALDI-TOF mass spectrometer equipped with a 1.3 m ion flight tube, delayed-extraction technology and a reflector analyser (Framingham, MA). Prior to mass spectrometry, protein samples were desalted and concentrated using microscale reversed-phase column (ZipTip_{C4}, Millipore, Bedford, USA) by washing with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and eluting with 80% acetonitrile and 0.1% TFA. The samples were mixed (1:10) with sinapinic acid matrix (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid, 10 mg/ml; Sigma, St Louis, USA), and 2 μ l (20 pmol) of the mixture was applied to the sample plate. All spectra were acquired in a positive linear mode with a 25 kV acceleration voltage. For each sample, mass spectra were obtained by accumulating 200 shots and by averaging five measurements, and a close external calibration was performed using a protein mixture with mass range from 5734.59 Da to 44 613 Da. Processing of mass spectra was performed with the Data Explorer 4.0 software.

Circular dichroism measurements

CD spectroscopy was performed on a Chirascan spectropolarimeter (Applied Photophysics). Before measurements, the proteins were dialysed against 10 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl and 1 mM DTT. The experiments were performed at room temperature in a HELMA quartz cell with an optical path length of 0.02 cm. Each spectrum was obtained by averaging several scans recorded from 200 to 260 nm with a bandwidth of 2 nm, a step of 1 nm and a scan speed of 20 nm/min. Control spectra of liposomes in buffer were subtracted from the protein spectra. The spectra were analysed in the 200–240 nm range with the CDPro software (Sreerama and Woody, 2000), which contains three fitting algorithms and a set of reference spectra (SMP50). The percentages of secondary structure given in Results are those estimated with the CONTIN/LL algorithm, which gave the best fits.

Acknowledgements

We thank Sabine Scarzello for mass spectrometry analysis and the plateforme RIO (Centre de Biochimie Structurale, Montpellier) for sharing the CD instrument. We thank Richard Premont for reagents and Dan Cassel, Marc Chabre, Michel Franco, Harvey McMahon and Sonia Paris for discussions. This work was supported by the CNRS (ACI 'jeune chercheur' and ACI 'dynamique et réactivité des assemblages biologiques') and the EMBO Young Investigator Programme. G Drin is supported by a CNRS postdoctoral fellowship.

References

- Antonny B, Beraud-Dufour S, Chardin P, Chabre M (1997a) N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry* **36**: 4675–4684
- Antonny B, Huber I, Paris S, Chabre M, Cassel D (1997b) Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem* **272**: 30848–30851
- Antonny B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2001) Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* **3**: 531–537
- Antonny B, Schekman R (2001) ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 438–443
- Aoe T, Huber I, Vasudevan C, Watkins SC, Romero G, Cassel D, Hsu VW (1999) The KDEL receptor regulates a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor 1 by interacting with its non-catalytic domain. *J Biol Chem* **274**: 20545–20549
- Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**: 895–907
- Bigay J, Gounon P, Robineau S, Antonny B (2003) Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* **426**: 563–566
- Cornell RB, Northwood IC (2000) Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocalization. *Trends Biochem Sci* **25**: 441–447
- Cukierman E, Huber I, Rotman M, Cassel D (1995) The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science* **270**: 1999–2002
- Dafforn TR, Smith CJ (2004) Natively unfolded domains in endocytosis: hooks, lines and linkers. *EMBO Rep* **5**: 1046–1052
- Desai A, Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 83–117
- Donaldson JG (2000) Filling in the GAPS in the ADP-ribosylation factor story. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3792–3794
- Farsad K, De Camilli P (2003) Mechanisms of membrane deformation. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 372–381
- Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, McMahon HT (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**: 361–366
- Franco M, Chardin P, Chabre M, Paris S (1995) Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg^{2+} levels. *J Biol Chem* **270**: 1337–1341
- Futai E, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2004) GTP/GDP exchange by Sec12p enables COPII vesicle bud formation on synthetic liposomes. *EMBO J* **23**: 4146–4155
- Goldberg J (1999) Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatomer in GTP hydrolysis. *Cell* **96**: 893–902
- Huber I, Rotman M, Pick E, Makler V, Rothem L, Cukierman E, Cassel D (2001) Expression, purification, and properties of ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase activating protein-1. *Methods Enzymol* **329**: 307–316
- Kirchhausen T (2000) Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 187–198
- Lanoix J, Ouwendijk J, Stark A, Szafer E, Cassel D, Dejgaard K, Weiss M, Nilsson T (2001) Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *J Cell Biol* **155**: 1199–1212
- Lewis SM, Poon PP, Singer RA, Johnston GC, Spang A (2004) The ArfGAP Glo3 is required for the generation of COPI vesicles. *Mol Biol Cell* **15**: 4064–4072
- Liu W, Duden R, Phair RD, Lippincott-Schwartz J (2005) ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells. *J Cell Biol* **168**: 1053–1063
- Majoul I, Straub M, Hell SW, Duden R, Soling HD (2001) KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell* **1**: 139–153
- Mandiyan V, Andreev J, Schlessinger J, Hubbard SR (1999) Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *EMBO J* **18**: 6890–6898
- McMahon HT, Mills IG (2004) COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 379–391
- Pasqualato S, Renault L, Cherfils J (2002) Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for ‘front-back’ communication. *EMBO Rep* **3**: 1035–1041
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**: 495–499
- Poon PP, Cassel D, Huber I, Singer RA, Johnston GC (2001) Expression, analysis, and properties of yeast ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase activating proteins (GAPs) Gcs1 and Glo3. *Methods Enzymol* **329**: 317–324
- Poon PP, Cassel D, Spang A, Rotman M, Pick E, Singer RA, Johnston GC (1999) Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *EMBO J* **18**: 555–564
- Poon PP, Wang X, Rotman M, Huber I, Cukierman E, Cassel D, Singer RA, Johnston GC (1996) *Saccharomyces cerevisiae* Gcs1 is an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10074–10077
- Premont RT, Vitale N (2001) Purification and characterization of GIT family of ADP-ribosylation factor (ARF) GTPase-activating proteins. *Methods Enzymol* **329**: 335–343
- Randazzo PA, Hirsch DS (2004) Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell Signal* **16**: 401–413
- Rein U, Andag U, Duden R, Schmitt HD, Spang A (2002) ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat. *J Cell Biol* **157**: 395–404
- Reinhard C, Schweikert M, Wieland FT, Nickel W (2003) Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8253–8257
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM (1992) The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* **33**: 141–166
- Sreerama N, Woody RW (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**: 252–260
- Stahelin RV, Long F, Peter BJ, Murray D, De Camilli P, McMahon HT, Cho W (2003) Contrasting membrane interaction mechanisms of AP180 N-terminal homology (ANTH) and epsin N-terminal homology (ENTH) domains. *J Biol Chem* **278**: 28993–28999
- Szafer E, Rotman M, Cassel D (2001) Regulation of GTP hydrolysis on ADP-ribosylation factor-1 at the Golgi membrane. *J Biol Chem* **276**: 47834–47839
- Tanigawa G, Orci L, Amherdt M, Ravazzola M, Helms JB, Rothman JE (1993) Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol* **123**: 1365–1371
- Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL (2005) Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J Biol Chem* **280**: 9595–9603
- Watson PJ, Frigerio G, Collins BM, Duden R, Owen DJ (2004) Gamma-COP appendage domain—structure and function. *Traffic* **5**: 79–88
- Yang JS, Lee SY, Gao M, Bourgoign S, Randazzo PA, Premont RT, Hsu VW (2002) ARFGAP1 promotes the formation of COPI vesicles, suggesting function as a component of the coat. *J Cell Biol* **159**: 69–78
- Yu S, Roth MG (2002) Casein kinase I regulates membrane binding by ARF GAP1. *Mol Biol Cell* **13**: 2559–2570
- Zhu Y, Traub LM, Kornfeld S (1998) ADP-ribosylation factor 1 transiently activates high-affinity adaptor protein complex AP-1 binding sites on Golgi membranes. *Mol Biol Cell* **9**: 1323–1337

b) Un autre motif ALPS dans ArfGAP1 : Implication dans la réponse à la courbure

C'est grâce au programme HCA (*Hydrophobic Cluster Analysis*) que nous avons vu un deuxième motif ALPS putatif dans la protéine ArfGAP1 (figure 1, article 2). La représentation HCA d'une séquence, qui tient compte de la répartition des résidus dans l'espace, est particulièrement intéressante pour repérer les éventuelles structures secondaires des protéines, mais aussi par exemple, les régions susceptibles de se replier en hélices amphipathiques (Gaboriaud et al., 1987). Une séquence non loin en aval du motif ALPS semblait présenter un profil physico-chimique similaire à ce dernier. La projection en hélice de cette séquence montre clairement une face hydrophobe séparée d'une face polaire riche et résidus sérine et thréonine. Pour vérifier l'existence de cet 'ALPS2', nous avons réalisé des expériences de flottaison sur des liposomes de différentes tailles ainsi que des expériences de dichroïsme circulaire. Comme nous l'attendions, le motif ALPS2 se lie préférentiellement sur des petits liposomes en se repliant en hélice amphipathique à leur surface (figure 2, article 2). De plus, la substitution d'un résidu hydrophobe au milieu de la face apolaire par un résidu polaire et chargé (V279D) abolit la liaison de ce motif sur des membranes courbées ainsi que son changement de structure secondaire, confirmant la nature amphipathique de ce motif ALPS2. Puisque nous avons vu précédemment qu'un seul ALPS est nécessaire pour qu'ArfGAP1 soit actif sur Arf1 à la surface de membranes courbées, nous nous sommes posé la question suivante: Quelle est la contribution de ce motif supplémentaire dans la liaison et dans la reconnaissance de la courbure membranaire d'ArfGAP1 ? En d'autres termes, quel est l'intérêt pour ArfGAP1 d'avoir un deuxième ALPS ?

D'abord nous avons montré qu'ALPS2 contribue à la localisation golgienne d'ArfGAP1. En effet, la localisation périnucléaire, caractéristique du Golgi, de la région non catalytique d'ArfGAP1 possédant les deux motifs ALPS, est fortement réduite lorsque le motif ALPS2 est rendu 'défectueux' par la mutation V279D (figure 3, article 2). Ensuite, nous avons réalisé des expériences de flottaison et d'activité avec la protéine ArfGAP1 entière, portant ou non des mutations invalidantes pour les motifs ALPS. Ceci nous a permis d'une part de déterminer que le motif ALPS2 contribue à la sensibilité d'ArfGAP1 à la courbure membranaire, et d'autre part qu'il existe une synergie entre les deux motifs ALPS dans l'adsorption membranaire de la protéine ArfGAP1 (figure 4, article 2).

Nous voulions définir de manière plus quantitative cette aide mutuelle entre les deux motifs ALPS pour leur liaison membranaire. Pour cela nous avons mesuré l'adsorption membranaire de trois différents peptides, comportant soit ALPS1, soit ALPS2, ou possédant

les motifs ALPS1 et ALPS2 en tandem. Nous avons profité du fait que chacun des deux motifs ALPS porte un résidu tryptophane qui pourrait subir un changement d'environnement lors de l'adsorption membranaire du peptide, et ainsi agir en tant que sonde intrinsèque de fluorescence. Comme nous l'attendions, un *blue-shift* du pic d'émission de fluorescence a été observé avec les trois peptides en présence de petits liposomes, suggérant le déplacement des tryptophanes d'un environnement polaire vers un environnement hydrophobe (figure 5A, article 2). Ensuite, la diminution de l'intensité de fluorescence émise, observée en fonction de la concentration de lipides, nous a permis de quantifier la partition membranaire des ces différents peptides. De façon remarquable, nos résultats ont révélé que la présence du motif ALPS2 accroît l'interaction membranaire du peptide 40 fois, confirmant ainsi la synergie entre ALPS1 et ALPS2 observée plus tôt.

Afin d'estimer la contribution d'ALPS2 dans la réponse de la protéine ArfGAP1 à la courbure membranaire, nous avons comparé l'adsorption du peptide ALPS1-ALPS2 à celle d'ALPS1 seul sur des liposomes de différentes tailles (figure 6A, article 2). Pour cela, nous avons eu recours à une sonde fluorescente extrinsèque, greffée sur les peptides de manière covalente. Nos résultats ont indiqué que les deux peptides sont d'excellents senseurs de courbure membranaire. Toutefois, de façon importante, ils ne répondent pas à la même 'gamme' de courbure membranaire : La réponse du peptide ALPS1-ALPS2 vis-à-vis des rayons des liposomes utilisés est décalée de plus de 20 nm par rapport à la réponse observée avec ALPS1. Parallèlement, nous avons mesuré l'activité d'hydrolyse du GTP d'Arf1 lié sur des liposomes de différentes tailles par ArfGAP1 sauvage ou par ArfGAP1 V279D (défectueux pour ALPS2). De manière similaire, si la vitesse d'hydrolyse du GTP d'Arf1 catalysé par ces deux GAP augmente en fonction de la courbure membranaire, le seuil de détection de la courbure leur permettant d'avoir une activité d'hydrolyse, est déplacé d'approximativement 20 nm. Donc, le nombre d'ALPS engagé semble déterminer la gamme de courbure à laquelle va répondre la protéine ArfGAP1.

Puisque le niveau d'insaturation des chaînes grasses des lipides d'une membrane est un paramètre qui influence aussi la liaison d'ArfGAP1. Nous voulions savoir si seul ALPS1 pouvait être suffisant pour détecter le changement de courbure d'une membrane dont les lipides sont riches en acides gras insaturés (de type DO). Pour cela, nous avons comparé l'activité d'hydrolyse d'ArfGAP1 sauvage et V279D sur des liposomes de différentes tailles dans des conditions membranaires classiques de type Golgi-mix, ou comportant une fraction de lipides insaturés. Nos expériences ont révélé que l'utilisation de liposomes riches en lipides insaturés décale la réponse des protéines GAP à la courbure vers des rayons plus larges. De

façon intéressante, dans ces conditions, la réponse à la courbure d'ArfGAP1 V279D, où seul ALPS1 est valide, est similaire à la réponse de la protéine ArfGAP1 sauvage dans des conditions lipidiques classiques. Ainsi, l'engagement d'un ou de deux motifs ALPS dans ArfGAP1 pourrait être un moyen pour cette protéine d'ajuster sa réponse en fonction de la composition lipidique des membranes.

ARTICLE 2 :

Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature

**Bruno Mesmin, Guillaume Drin, Sharon Levi,
Moran Rawet, Dan Cassel, Joëlle Bigay,
Bruno Antony**

Two Lipid-Packing Sensor Motifs Contribute to the Sensitivity of ArfGAP1 to Membrane Curvature[†]

Bruno Mesmin,[‡] Guillaume Drin,[‡] Sharon Levi,[§] Moran Rawet,[§] Dan Cassel,[§] Joëlle Bigay,[‡] and Bruno Antony^{*;‡}

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS et Université de Nice-Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France, and Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa 32000, Israel

Received November 6, 2006; Revised Manuscript Received December 7, 2006

ABSTRACT: ArfGAP1 (Arf GTPase activating protein 1) controls the cycling of the COPI coat on Golgi membranes by catalyzing GTP hydrolysis in the small G protein Arf1. ArfGAP1 contains a central motif named ALPS (ArfGAP1 lipid-packing sensor) that adsorbs preferentially onto highly curved membranes. This motif allows coupling of the rate of GTP hydrolysis in Arf1 with membrane curvature induced by the COPI coat. Upon membrane adsorption, the ALPS motif folds into an amphipathic α -helix. This helix contrasts from a classical membrane-adsorbing helix in the abundance of S and T residues and the paucity of charged residues in its polar face. We show here that ArfGAP1 contains a second motif with similar physicochemical properties. This motif, ALPS2, also forms an amphipathic α -helix at the surface of small vesicles and contributes to the Golgi localization of ArfGAP1 *in vivo*. Using several quantitative assays, we determined the relative contribution of the two ALPS motifs in the recognition of liposomes of defined curvature and composition. Our results show that ALPS1 is the primary determinant of the interaction of ArfGAP1 with lipid membranes and that ALPS2 reinforces this interaction 40-fold. Furthermore, our results suggest that depending on the engagement of one or two functional ALPS motifs, ArfGAP1 can respond to a wide range of membrane curvature and can adapt to lipid membranes of various acyl chain compositions.

The COPI coat drives the budding of small transport vesicles from the Golgi apparatus (1, 2). Like other protein coats, it shapes mechanically the lipid membrane into a spherical structure (diameter of ca. 60 nm) and selects cargo proteins for transport. COPI assembly begins with the translocation of the small G protein Arf1 upon GDP–GTP exchange, a reaction that is catalyzed by specific guanine nucleotide exchange factors associated with Golgi membranes. Membrane-bound Arf1-GTP then recruits coatomer, a large cytosolic complex that is somewhat similar with clathrin and its adaptors (3). After being recruited, coatomer polymerizes into a coat and interacts with the cytosolic extension of membrane proteins, thereby facilitating their incorporation into the nascent vesicle. In analogy with other protein coats, membrane deformation probably results from the intrinsic curvature of the COPI lattice as well as the partial embedding of the N-terminal myristoylated amphipathic helix of Arf1-GTP in the lipid bilayer (4).

GTP hydrolysis in Arf1 is required for the disassembly of the COPI coat. This reaction, which is catalyzed in the

Golgi by specific GTPase activating proteins (ArfGAP1¹ and ArfGAP3 in mammals and Gcs1p and Glo3p in yeast), must be finely tuned and somehow linked to the completion of vesicle formation in terms of both cargo recruitment and membrane shaping (5). Thus, if the concentration of cargo molecules is too low in a COPI-coated area, GTP hydrolysis may serve to promote early coat disassembly before the formation of a useless “empty” vesicle. On the other hand, if there are enough cargo molecules incorporated, GTP hydrolysis should be tuned to permit coat disassembly only after vesicle formation. At the molecular level, several mechanisms for the control of GTP hydrolysis in Arf1 have been envisaged, which are based on the multiple interactions that ArfGAPs can make in a COPI-coated area: with coatomer (6–8), with the cytoplasmic region of membrane proteins (8–10), and with the lipid membrane (11–13).

ArfGAP1 is a 415-amino acid cytosolic protein that associates in a dynamic manner with the Golgi apparatus where it controls COPI coat cycling (14, 15). The first 136 residues of ArfGAP1 form the GAP catalytic domain, which is built on a characteristic Zn-finger fold and promotes GTP hydrolysis on Arf1. After the GAP domain and up to the C-terminus, no other well-defined structural domain has been identified. Instead, limited-proteolysis experiments and cir-

[†] This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche (“programme blanc”) and by the CNRS and the ministère de la recherche (Action Concertée Incitative “dynamique et réactivité des assemblages biologiques”). Work in the laboratory of D.C. was supported by a grant from the Israel Science Foundation (448/04).

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: antony@ipmc.cnrs.fr. Phone: 33 4 93 95 77 75. Fax: 33 4 93 95 77 10.

[‡] CNRS et Université de Nice-Sophia Antipolis.

[§] Technion-Israel Institute of Technology.

¹ Abbreviations: ALPS, ArfGAP1 lipid-packing sensor; ArfGAP1, Arf GTPase activating protein 1; CD, circular dichroism; DLS, dynamic light scattering; DOPE, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; DOPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; GST, glutathione S-transferase; MRE, mean residue ellipticity; NBD, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole.

cular dichroism (CD) measurements suggest that the non-catalytic region of ArfGAP1 may be largely unfolded (6, 16). It is in this poorly defined region where the information for the targeting of ArfGAP1 to the Golgi apparatus resides (15, 17, 18). The molecular detail of this targeting is not known, but a combination of interactions with transmembrane proteins, with the COPI coat, and with lipids is likely.

In vitro, the activity of ArfGAP1 is highly sensitive to membrane curvature. Using model liposomes of a defined size, we showed that the rate of GTP hydrolysis in membrane-bound Arf1 catalyzed by ArfGAP1 increases by up to 2 orders of magnitude as the liposome radius decreases from ca. 150 to 30 nm, a range of curvature that is typical of coat-driven budding reactions (19). Because the effect of membrane curvature on ArfGAP1 activity also applies when Arf1-GTP is engaged in the COPI coat, we suggested a negative feedback loop where COPI assembly drives membrane curvature, which in turn prepares the coat for disassembly by recruiting and/or activating ArfGAP1, thereby promoting GTP hydrolysis in Arf1 (19). We have recently identified a motif within the noncatalytic region of ArfGAP1 that responds to membrane curvature (16). This motif of ~40 residues named ALPS (for ArfGAP1 lipid-packing sensor) is located at the center of the primary sequence, around W211. In solution, the ALPS motif is not structured. However, at the surface of highly curved membranes, it forms an amphipathic α -helix. The most noticeable feature of this α -helix is the abundance of serine and threonine residues in its polar face (4, 16). Because Ser and Thr cannot make electrostatic interactions with lipid polar heads, the adsorption and/or folding of the ALPS motif is driven solely by the insertion of hydrophobic residues between lipids and is thus strongly favored by the creation of lipid packing defects such as those introduced by high membrane curvature. Site-directed mutagenesis reveals that hydrophobic residues in the ALPS motif are indeed critical for the association of ArfGAP1 with model liposomes, for its activity toward membrane-bound Arf1-GTP as well as for its Golgi localization (16, 18). Moreover, replacing S/T residues in the polar face with basic residues makes the ALPS motif much less sensitive to membrane curvature for its adsorption to negatively charged liposomes (G. Drin, personal communication).

Here we report that ArfGAP1 contains a second motif that, despite an amino acid sequence quite distant from the originally described ALPS motif, shares the same general physicochemical properties. This second ALPS motif also forms an amphipathic α -helix at the surface of highly curved liposomes and contributes together with the first ALPS motif to the recognition of membrane curvature by ArfGAP1.

MATERIALS AND METHODS

Protein Expression and Purification. All point mutations were introduced using the Quik-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The full-length sequence of rat ArfGAP1 (residues 1–415) with silent mutations for expression in *Escherichia coli* (8) was PCR amplified and cloned into the pET16b vector (Novagen) between NdeI and BamHI sites. The protein was expressed in *E. coli* and purified from inclusion bodies as described for the construct of residues 1–257 (16). Fragments of ArfGAP1 in a fusion with GST

were cloned in a pGEX-2T expression vector (Pharmacia), which includes a thrombin cleavage site. For protein purification, transformed bacteria were resuspended in 50 mM Tris (pH 7.4) and 150 mM NaCl (TN buffer), supplemented with 1 mM PMSF, 1 μ M pepstatin, 10 μ M bestatin, 10 μ M phosphoramidon, and a cocktail of anti-proteases (Roche) and broken with a French press. The supernatant was incubated for 1 h with glutathione–Sephrose 4B beads (Amersham). The beads were washed three times with TN buffer, and the GST fusions were eluted in the same buffer supplemented with 10 mM glutathione. Alternatively, the beads were incubated with thrombin to allow the elution of the ArfGAP1 peptides. The peptides were further purified by HPLC on a Chromolith C18 column (Merck) with an acetonitrile gradient. The peptide identity was checked by mass spectrometry. The ArfGAP1 peptides were lyophilized and stored at -20°C before being used.

NBD Labeling. The ALPS1 peptide (residues 192–257) and the ALPS1–ALPS2 peptide (residues 192–304), both carrying the A236C mutation, were resuspended in 50 mM Hepes (pH 7.2) and 120 mM potassium acetate (HK buffer) at a final concentration between 40 and 200 μ M. A 10-fold molar excess of *N,N*-dimethyl-*N*-(iodoacetyl)-*N'*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)ethylenediamine (IANBD amide, Molecular Probes) in dimethylformamide (stock solution at 5 mM) was added, and the mixture was incubated at room temperature for 90 min. The reaction was stopped by the addition of 10 mM dithiothreitol. The sample was further purified on a Chromolith C18 column (Merck) using an acetonitrile gradient. Labeled products were detected by measuring the absorbance at three wavelengths (220, 280, and 478 nm) followed by SDS–PAGE analysis and direct visualization of the gel in a fluorescence imaging system (LAS 3000, Fuji). The identity of the labeled peptides was confirmed by mass spectrometry.

Liposomes. Lipids in chloroform were purchased from Avanti Polar Lipids except egg PC (Sigma) and NBD-PE (Molecular Probes). A lipid film containing (mole percent) egg PC (50), liver PE (19), brain PS (5), liver PI (10), cholesterol (16), and, when indicated, NBD-PE (0.2) was prepared by evaporation. The film was resuspended in HK buffer. After five steps of thawing and freezing in liquid nitrogen, the liposome suspension was extruded sequentially through (pore size) 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, and 0.03 μ m polycarbonate filters using a hand extruder (Avanti). Alternatively, very small liposomes were prepared by sonication with a titanium tip sonicator (Misonix). Titanium and lipid debris were removed by centrifugation at 100000g for 20 min to produce a homogeneous population of liposomes. The liposome radius was estimated by dynamic light scattering (DLS) using a Dyna Pro instrument. Liposomes were stored at room temperature and used within 2 days.

Flotation Experiments. Proteins (0.5–1 μ M) and NBD-labeled liposomes (0.5–1 mM) were incubated in 50 mM Hepes (pH 7.2), 120 mM potassium acetate, and 1 mM MgCl_2 (HKM buffer) at room temperature for 5 min in a total volume of 150 μ L. The suspension was then adjusted to 30% (w/v) sucrose and overlaid with 200 μ L of HKM buffer containing 25% (w/v) sucrose and with 50 μ L of HKM buffer containing no sucrose. The sample was centrifuged at 240000g in a Beckman swing rotor (TLS 55) for 1 h. The 100 μ L top fraction was collected manually using a Hamilton

syringe and analyzed by SDS-PAGE using Sypro-orange staining (Molecular Probes). The gels were visualized in a FUJI LAS-3000 fluorescence imaging system.

GTPase Measurements. The activity of ArfGAP1 on Arf1 was measured by a tryptophan fluorescence assay (20). The experiments were performed in a cylindrical quartz cuvette (600 μL) equilibrated at 37 °C and equipped with a magnetic bar for continuous stirring. Tryptophan fluorescence was measured at 340 nm (bandwidth of 10 nm) upon excitation at 297.5 nm (bandwidth of 1.5 nm) in a Shimadzu RF-5301-PC spectrofluorometer. The cuvette initially contained liposomes of a defined size (200 μM lipids) in HKM buffer. At the indicated times, myristoylated Arf1-GDP (0.5 μM), GTP (50 μM), and EDTA (2 mM) were sequentially added to promote the replacement of GDP with GTP. When nucleotide exchange was complete, 2 mM MgCl_2 was added, followed by the addition of ArfGAP1 (50 nM) to initiate GTP hydrolysis.

Tryptophan Fluorescence Measurements of the Partitioning of ALPS Peptides on Liposomes. To assess the binding of the various ArfGAP1 peptides to liposomes, the decrease in tryptophan fluorescence at 370 nm of a solution containing 1 μM peptide in HK buffer was measured upon stepwise additions of sonicated liposomes from a concentrated stock solution. The experiments were performed at 37 °C in a cylindrical quartz cuvette while the sample was continuously stirred. The added liposomes scattered light and slightly diluted the sample. To correct for these effects, two control experiments were performed (21), one in which the liposomes were added to the buffer and a second in which the liposomes were added to a solution of tryptophan in the zwitterionic form, which remains soluble. After i additions of liposomes, the fluorescence levels in the experiments with the peptide, with the buffer, and with tryptophan are F_i , L_i , and W_i , respectively.

The specific fluorescence change due to liposome binding is

$$\Delta F_i = (F_i - L_i)[W_0/(W_i - L_i)] - F_0 \quad (1)$$

This change is proportional to the amount of liposome-bound peptide:

$$\Delta F = f[P_m] \quad (2)$$

The following equation describes the partitioning of a peptide between the aqueous phase and the liposome surface:

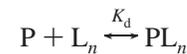
$$[P_m] = ([P_t][L])/ (K_p + [L]) \quad (3)$$

where $[P_t]$ is the total concentration of peptide, $[P_m]$ is the concentration of peptide that is bound to the lipid membrane, and $[L]$ is the concentration of lipids that is accessible to the peptide. When the liposomes are monolamellar and when the concentration of lipids is large enough that the liposome surface covered by the peptide can be neglected compared to the total liposome surface, $[L]$ can be estimated as approximately one-half of the total lipid concentration ($0.5[L_t]$) because only the outer monolayer is accessible. Because very small liposomes were used in these titration experiments ($R_h = 25$ nm), there is a slight excess of lipids in the outer leaflet, and therefore, a better approximation is $[L] = 0.55[L_t]$. Thus, one obtains

$$[P_m] \approx (0.55[P_t][L_t]) / (K_p + 0.55[L_t]) \quad (4)$$

K_p is a partition coefficient and is expressed in molar. It should not be considered as a true equilibrium constant for the binding of one peptide for one lipid but simply reflects the concentration of exposed lipids at which 50% of the peptide is bound to the liposome surface (22). This experimental partition coefficient can be converted into K_p' , a dimensionless coefficient, which directly reflects the preference of the peptide for the lipid phase compared to the water phase ($K_p' = [H_2O]/K_p$). Thus, if $K_p = 1$ mM, $K_p' = 55\,500$, meaning that the peptide has a 55500-fold preference for the lipid phase compared to the bulk water phase.

When a peptide adsorbs significantly at low lipid concentrations, the approximation $[L] \approx 0.55[L_t]$ is no longer valid because bound peptides occupy a large fraction of the liposome surface. In that case, it is easier to consider a scheme where each bound peptide occupies a membrane patch consisting of n lipids with an apparent equilibrium constant, K_d (23):



The corresponding quadratic equation is

$$[P_m] = [PL_n] = 0.5\{[P_t] + 0.55[L_t]/n + K_d - [([P_t] + 0.55[L_t]/n + K_d)^2 - 2.2[P_t][L_t]/n]^{1/2}\} \quad (5)$$

Note that $K_p = nK_d$ and $K_p' = [H_2O]/(nK_d)$.

Equations 4 and 5 with the proportionality factor (f) are used to fit the data. Equation 4 is used for peptides having a low avidity for membranes as it has only two parameters (K_p and f). When eq 4 fails to fit the data, eq 5 is used, giving three parameters, K_d , n , and f .

NBD Fluorescence. NBD-labeled ALPS peptides (1 μM) were incubated at 37 °C with Golgi-mix liposomes (600 μM) of defined radius in HK buffer supplemented with 1 mM DTT. Emission fluorescence spectra were measured from 520 to 680 nm (bandwidth of 5 nm) upon excitation at 505 nm (bandwidth of 5 nm) in a small quartz cell (total volume of 100 μL). Control spectra were acquired in the absence of peptide to subtract the light scattering signal from the liposomes. The corrected fluorescence intensity at 529 nm was plotted as a function of liposome radius.

CD Spectroscopy. Lyophilized peptides were resuspended in 10 mM Tris (pH 7.5) and 150 mM KCl and ultracentrifuged to eliminate aggregates. The absorbance at 280 nm was used to determine the peptide concentration in the supernatant. CD measurements were performed at room temperature in a quartz cell with an optical path length of 0.05 cm. Spectra were recorded on a Jasco J-815 spectrometer at a scan speed of 50 nm/min and with a bandwidth of 1 nm. The spectra that are shown are the average of two to four recordings and were corrected for the buffer or liposome background. Secondary structure analysis was performed using three methods: SELCON3, CONTILL, and CDSSTR (24).

Cell Transfection and Fluorescence Microscopy. The procedures that were employed have previously been described (18). Briefly, ArfGAP1 (residues 143–415) and mutants thereof were cloned into eGFP-C2 (Clontech). The

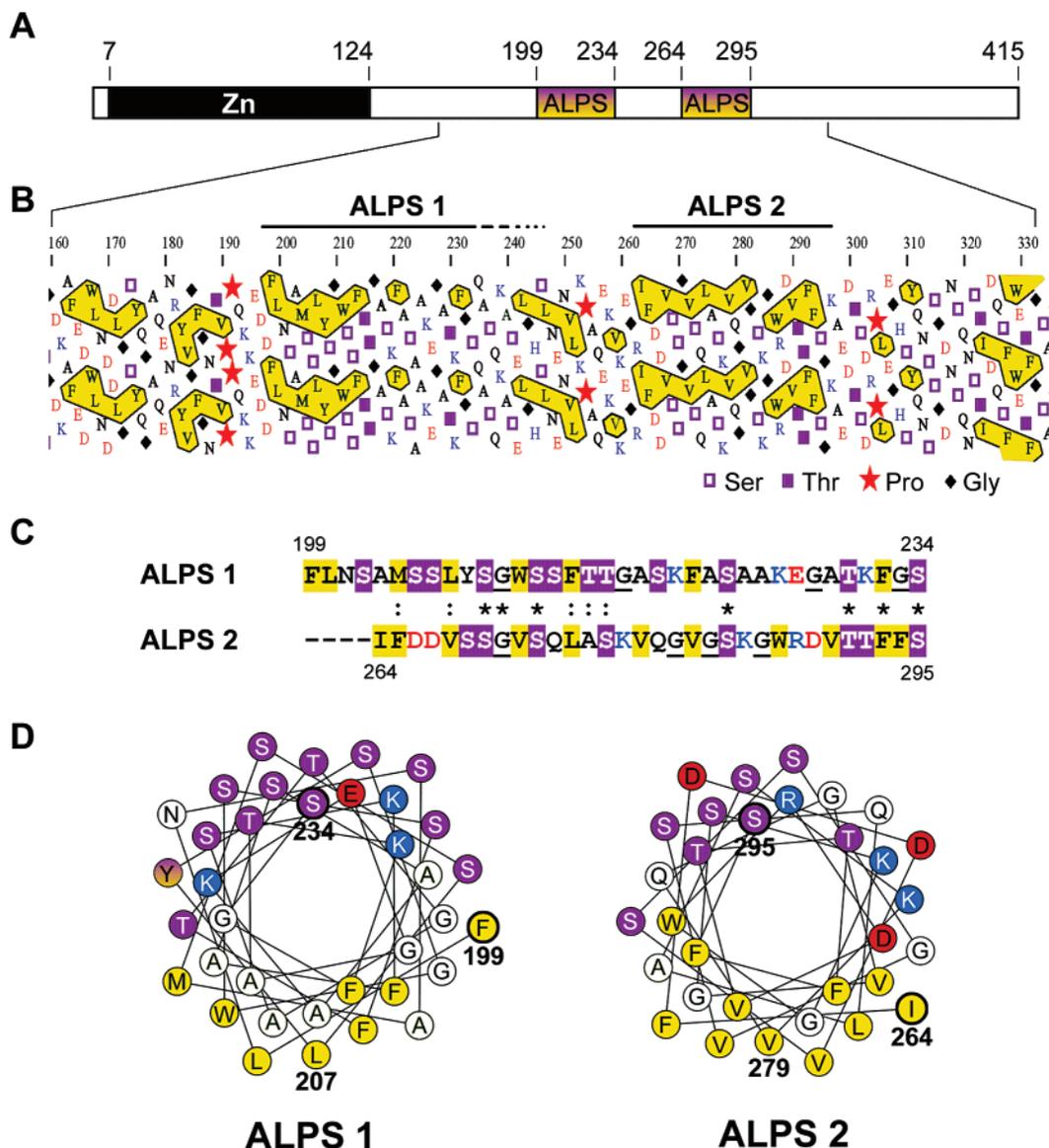


FIGURE 1: Identification of a second putative ALPS motif in the ArfGAP1 sequence. (A) Localization of the ALPS1 and ALPS2 motifs in ArfGAP1. (B) HCA plot of the central region of ArfGAP1. The primary sequence is written along parallel and nearly vertical lines and is duplicated. P, G, S, and T residues are represented by symbols as indicated. Yellow areas represent hydrophobic clusters (F, I, L, M, V, W, and Y). A horizontal cluster is indicative of an α -helix as this corresponds to the regular spacing of hydrophobic residues every three or four residues. The ALPS1 and ALPS2 motifs include such a cluster and are also characterized by the abundance of S and T residues (mauve squares). (C) Sequence alignment of ALPS1 and ALPS2 obtained with Clustal W. Note the low level of amino acid identity. (D) Projections of the ALPS1 and ALPS2 motifs on a helical wheel. The resemblance between the two motifs is obvious in this representation: the segregation between S/T residues (mauve) and hydrophobic residues (yellow). Basic and acidic residues are colored blue and red, respectively. The hydrophobic residues that have been mutated into Asp in this study are denoted.

GFP fusions were transfected into HeLa cells and visualized 24 h later under a Leica DMIRE2 inverted fluorescence microscope at a 40 \times magnification.

RESULTS

Identification of a Second Putative ALPS-like Motif in the ArfGAP1 Sequence. Using HCA [Hydrophobic Cluster Analysis (<http://bioserv.rpbs.jussieu.fr/RPBS>)], which highlights the regular distribution of hydrophobic residues in protein sequences and is used to predict the propensity of a region to form secondary structures (25), we noticed that, despite a low level of amino acid identity, the region between I264 and S295 of ArfGAP1 shows some similarities with the ALPS motif, defined as F199–S234 (Figure 1A–C). Three points are noteworthy. First, both sequences exhibit a

regular distribution of hydrophobic residues with a periodicity of three to four amino acids, a feature suggestive of an amphipathic α -helical structure as illustrated by helical-wheel projections (Figure 1D). Second, among the polar residues that are intercalated between the hydrophobic residues, many are Ser and Thr residues. In contrast, basic and acidic residues are rare. Consequently, the polar face of the putative α -helix should be weakly charged (Figure 1D). Third, both sequences contain several glycine residues ($n = 4$), which should favor structural flexibility and notably a switch from a random coil to an α -helix conformation. We demonstrated previously that such a conformational change is coupled to the adsorption of the ALPS motif to highly curved membranes (16). In the following, we will refer to the new region as ALPS2, whereas the original ALPS motif will be called ALPS1.

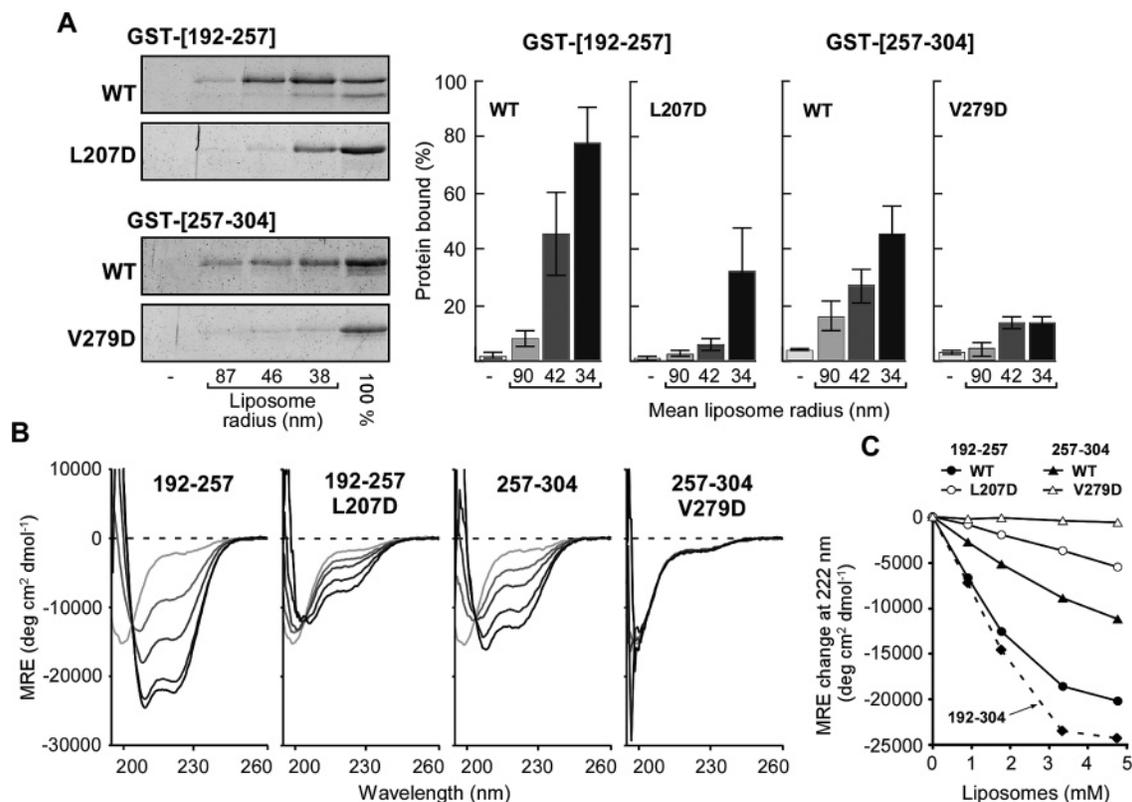


FIGURE 2: Binding and folding of the ALPS1 and ALPS2 motifs on model liposomes of a defined size. (A) For flotation experiments, GST constructs (0.75 μ M) containing the ALPS1 or ALPS2 motif of ArfGAP1 were incubated with Golgi-mix liposomes (0.75 mM lipids) of a defined size or with no liposome. When indicated, a residue in the hydrophobic face of the putative α -helix was replaced with an Asp residue (see Figure 1D). Liposome-bound proteins were recovered at the top of sucrose cushions and analyzed by SDS-PAGE (left panels). The 100% lane was used to determine the protein ratio in the top fraction. The right panels show the quantification (\pm standard error) of four independent experiments using different batches of liposomes. (B) Far-UV CD spectra of the ALPS1 and ALPS2 peptides (40 μ M) in solution or with increasing concentrations of small DOPC/DOPS (70:30) liposomes ($R_h = 16 \pm 7$ nm) obtained by sonication. From the lightest to the darkest curves, the lipid concentration was 0, 1.9, 1.75, 3.33, and 4.75 mM. Note the well-defined isodichroic point at 203 nm, which suggests a simple two-state equilibrium between a random-coil conformation in solution and an α -helical conformation on liposomes. (C) Change in mean residue ellipticity (MRE) at 222 nm as a function of lipid concentration for the four peptides that were tested. Also shown are the results obtained with the ALPS1-ALPS2 peptide [residues 192-304 (- -)].

Membrane Partitioning and Folding of the Isolated ALPS2 Motif. To determine if the ALPS2 motif can act as a sensor of membrane curvature, we expressed and purified the fragment of residues 257-304 of ArfGAP1 in a fusion with GST (GST-ALPS2) and assessed its avidity for liposomes of a defined size by a flotation assay. As a control, the same experiment was carried out with GST-ALPS1 (residues 192-257 of ArfGAP1). The liposomes contained a mixture of lipids that mimics the Golgi composition (Golgi-mix) and were calibrated in size by extrusion through polycarbonate filters of a defined pore size (from 400 to 30 nm). With this method, we could vary the average liposome radius from 130 to 30 nm as estimated by dynamic light scattering (DLS). The protein was mixed with liposomes at a protein:lipid molar ratio of 1:1000, and the liposomes were then recovered at the top of sucrose cushions by ultracentrifugation. The fraction of liposome-bound protein was quantified by SDS-PAGE using the fluorescent dye Sypro-orange.

As shown in Figure 2A, GST-ALPS2 bound to Golgi-mix liposomes and exhibited a preference for small ($R_h = 38$ nm) versus large ($R_h = 87$ nm) liposomes. This suggests that ALPS2 can function, like ALPS1, as a sensor of membrane curvature. However, as compared to GST-ALPS1, less protein was recovered in the liposome fraction, suggesting that ALPS2 has less avidity for lipid membranes

than ALPS1. In addition, the dependency on liposome size was not as sharp as that observed for ALPS1.

Next, we used CD spectroscopy to determine the secondary structure of the ALPS2 peptide (residues 257-304) either in solution or bound to liposomes. A first CD spectrum of the peptide was recorded in buffer followed by measurements at increasing concentrations of small DOPC/DOPS liposomes made by sonication. As judged from the disappearance of the minimum at 200 nm and the appearance of two minima at 208 and 222 nm, the ALPS2 peptide, like ALPS1, switches from a random coil structure in solution to an α -helix conformation once bound to liposomes (Figure 2B). Plotting the mean residue ellipticity (MRE) at 222 nm against lipid concentration (Figure 2C) suggested, however, that ALPS2 has less avidity for lipid membranes than ALPS1, in agreement with the results of the flotation assay.

Because of their amphipathic nature, the α -helices formed by ALPS1 and ALPS2 should lie parallel to the lipid bilayer with the nonpolar face embedded in the hydrocarbon core of the membrane. Thus, replacing one hydrophobic residue in the nonpolar face of ALPS1 or ALPS2 with a negatively charged amino acid should strongly perturb the membrane partitioning and folding of these peptides. L207D and V279D mutations were introduced into the ALPS1 and ALPS2 constructs, respectively. As expected, the V279D mutation

nearly abolished the adsorption of GST–ALPS2 regardless of liposome size (Figure 2A). Moreover, the addition of small liposomes to the corresponding mutated ALPS2 peptide induced no increase in helicity (Figure 2B). The L207D mutation in the ALPS1 motif had a less drastic effect. First, substantial binding of GST–ALPS1[L207D] to small liposomes could be detected (Figure 2A). Second, a clear increase in the helicity of the corresponding mutated peptide was observed upon addition of sonicated liposomes (Figure 2B). However, plotting the change in ellipticity at 222 nm against lipid concentration suggests that the mutation markedly weakens the avidity of the ALPS1 peptide for lipid membranes as no saturation of the CD signal could be observed within the range of liposomes used in the experiments, in contrast to what was observed with the wild-type form (Figure 2C).

Taken together, the experiments shown in Figure 2 suggest that ArfGAP1 contains two motifs, ALPS1 and ALPS2, of ~35 amino acids that share similar physicochemical properties. These motifs show no well-defined structure in solution but adopt an α -helical conformation at the surface of lipid membranes. Furthermore, the partitioning–folding process is favored by reducing the size of the liposomes, suggesting that each motif can act as a sensor of membrane curvature. However, for a given liposome radius, it seems that the ALPS1 motif adsorbs more readily than the ALPS2 motif.

The ALPS2 Motif Contributes to the Golgi Localization of ArfGAP1. Having demonstrated that the isolated ALPS2 motif can act as a sensor of membrane curvature, we tested its functionality in vivo. It was shown previously that point mutations of conserved hydrophobic residues in the ALPS1 motif redistribute ArfGAP1 from the Golgi to the cytosol, thus providing the first in vivo evidence of the importance of the ALPS1 motif in the localization of ArfGAP1 (18). Furthermore, the effects observed for several mutations were compatible with a model in which the ALPS1 motif directly interacts with the lipid membrane through hydrophobic interactions (18). However, it was also noticed that the ALPS1 motif is not sufficient for Golgi targeting since the minimal construct that shows Golgi localization encompasses residues 203–334 and thus includes both ALPS motifs (17, 18). In addition, deletion of residues 259–280 was found to abrogate Golgi localization, pointing to a possible role of ALPS2 in this process (18). To test this possibility, we assessed the effect of the V279D mutation, which essentially abolished the binding of the isolated ALPS2 motif to liposomes (Figure 2), on the subcellular distribution of the noncatalytic region of ArfGAP1 (residues 143–415). In agreement with previous studies, the noncatalytic region of ArfGAP1, which was fused on its N-terminus to the carboxy terminus of GFP, showed a strong perinuclear staining, which is characteristic of the Golgi apparatus (17, 18). In contrast, the V279D mutant exhibited more diffuse localization, indicating a significant decrease in its level of interaction with the Golgi (Figure 3). Other Asp mutations of hydrophobic residues within the ALPS2 sequence (W287D and V290D) also caused a strong decrease in the level of ArfGAP1 Golgi localization (data not shown). Thus, the ALPS2 motif contributes to the Golgi targeting of ArfGAP1.

The ALPS2 Motif Contributes to the Sensitivity of ArfGAP1 to Membrane Curvature. Next we wished to determine the contribution of the ALPS2 motif to the sensitivity of

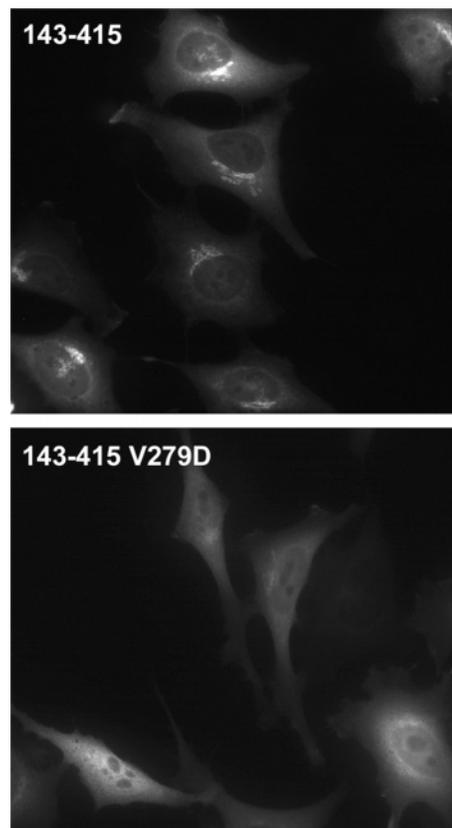


FIGURE 3: ALPS2 contributes to the Golgi localization of ArfGAP1. The noncatalytic region of ArfGAP1 (residues 143–415) fused to GFP was transiently expressed in HeLa cells. The V279D single mutation in the ALPS2 motif causes a strong reduction in the level of perinuclear localization.

ArfGAP1 to membrane curvature in vitro. For this, the L207D and/or the V279D mutations, which perturb the membrane partitioning of the isolated ALPS1 and ALPS2 motifs, respectively (see Figure 2A), were introduced in full-length ArfGAP1. The various ArfGAP1 proteins containing a hexahistidine tag at the N-terminus were purified by nickel chromatography followed by MonoQ chromatography. The wild-type form and the three mutants (L207D, V279D, and L207D/V279D) exhibited similar background GAP activity in solution on a soluble form of Arf1-GTP (Δ 17-Arf1), suggesting that the catalytic machinery residing in the N-terminal part was not affected by the mutations (data not shown).

Figure 4A shows that the L207D mutation and the V279D mutation caused a significant decrease in the level of adsorption of ArfGAP1 to Golgi-like liposomes, which remained however sensitive to liposome size. Importantly, combining the two mutations caused a more severe defect, suggesting that adsorption of ArfGAP1 to lipid membranes is governed by both motifs. It should be noted, however, that ArfGAP1[L207D/V279D] exhibits residual binding to small liposomes, which may be due to the fact that the L207D mutation does not completely abolish the binding of the ALPS1 motif to membranes (see Figure 2A).

The contribution of the two ALPS motifs was confirmed by measuring the GAP activity of the various mutants on liposome-bound Arf1-GTP (Figure 4B). GTP hydrolysis in Arf1 can be readily followed by tryptophan fluorescence because of the large difference between the fluorescence of

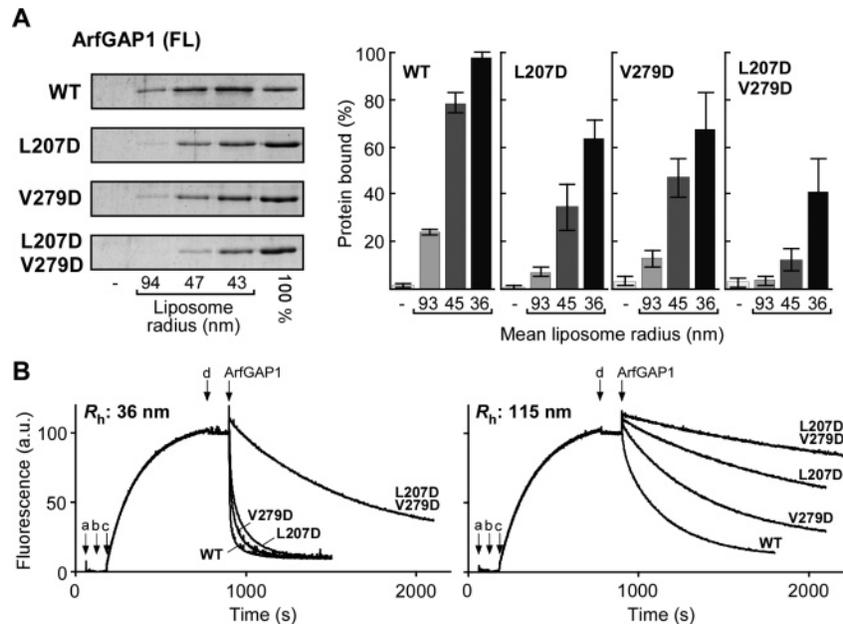


FIGURE 4: Synergy between the ALPS1 and ALPS2 motifs for the membrane adsorption of ArfGAP1 and its activity on Arf1-GTP. (A) Flotation experiments. Full-length ArfGAP1 carrying the indicated mutations in ALPS1 and/or ALPS2 was incubated with Golgi-mix liposomes of a defined size or with no liposome. Liposome-bound proteins were recovered at the top of sucrose cushions. The left panel shows the SDS-PAGE of a typical experiment. The right panels compile the results of two independent experiments using different batches of liposomes. (B) GAP assay. Arf1-GDP (injection a) was first incubated with small (left) or large (right) liposomes and converted to the GTP-bound form by the addition of an excess of GTP (b) and by the addition of 2 mM EDTA (c, giving 1 μ M free Mg^{2+}). Thereafter, an excess of $MgCl_2$ was added (d), and GTP hydrolysis was initiated by the addition of 50 nM ArfGAP1 bearing the indicated mutations.

Arf1-GTP (high fluorescence) and Arf1-GDP (low fluorescence). With small liposomes ($R_h = 36$ nm), where the time course of GTP hydrolysis induced by wild-type ArfGAP1 was very fast ($t_{1/2} = 6$ s), the L207D mutation and the V279D mutation caused modest decreases in the rate of GTP hydrolysis ($t_{1/2} = 29$ and 15 s, respectively). However, when the two mutations were combined, GTP hydrolysis was dramatically slowed ($t_{1/2} = 558$ s). This apparent synergy between the two mutations was also observed with large liposomes ($R_h = 115$ nm), where the rate of GTP hydrolysis induced by wild-type ArfGAP1 was very slow ($t_{1/2} = 99$ s). However, in that case, the effect of the individual mutations was more pronounced.

Quantitative Analysis of the Contribution of ALPS1 and ALPS2 to Membrane Adsorption. Having established that both ALPS motifs contribute to the binding of full-length ArfGAP1 to lipid membranes, we wished to study in a more quantitative manner the synergy between the two motifs. For this, we used spectroscopic assays by which one can compare the lipid binding properties of the individual ALPS peptides (residues 192–257 and residues 257–304) with that of a construct including the two motifs in tandem (residues 192–304).

We first took advantage of the fact that each ALPS motif carries a tryptophan residue (W211 in ALPS1 and W287 in ALPS2), which should experience a change in environment upon membrane binding and thus act as an intrinsic fluorescence probe of this event. Figure 5A shows the emission spectra of the ALPS1, ALPS2, and ALPS1–ALPS2 peptides in the absence or presence of sonicated liposomes ($R_h = 24 \pm 12$ nm). In all cases, a blue shift was observed, suggesting that the tryptophan groups are shifted from an aqueous environment to a nonpolar environment. The fluorescence decrease at 370 nm was then plotted as a

function of lipid concentration to determine the partition coefficient of the peptides (filled symbols in Figure 5B). For ALPS1, we could fit the data with a hyperbolic function giving an apparent partition coefficient (K_p) of ca. 290 μ M lipid. For ALPS2, we could have only a rough estimate of the partition coefficient since the fluorescence change showed no saturation within the range of lipid concentrations that was used (K_p in the millimolar range). Strikingly, the fluorescence change observed for the ALPS1–ALPS2 peptide was markedly different from that observed for the individual ALPS peptides. First, at any lipid concentration, the decrease in intensity was larger than the sum of the decreases measured for ALPS1 and ALPS2. Second, the dose–response curve showed a sharp shape with a saturation at lipid concentrations of >250 μ M, which contrasted with the smoother dose–response curves observed for the individual ALPS peptides. This suggested that the ALPS1–ALPS2 peptide has a much higher avidity for the lipid membrane than the isolated ALPS motifs. For the ALPS1–ALPS2 peptide, we could not fit the data with a classical hyperbolic function because the concentration of free lipid, which should be used in this equation, can no longer be approximated by the total lipid concentration. In other words, we have to take into account the fact that each bound peptide occupies a membrane patch of n lipids that is no longer available for the binding of other peptides (see Materials and Methods). Fitting the fluorescence change by a quadratic equation indicates that the ALPS1–ALPS2 peptide binds to a membrane patch of 108 (n) lipids with an apparent affinity (K_d) of 0.067 μ M. This gives for the corresponding partition coefficient (K_p) a value of $108 \times 0.067 = 7$ μ M. Compared to values of 290 μ M for ALPS1 and ca. 1 mM for ALPS2, this indicates that the combination of ALPS1 and ALPS2 results in a 40–100-fold increase in membrane binding.

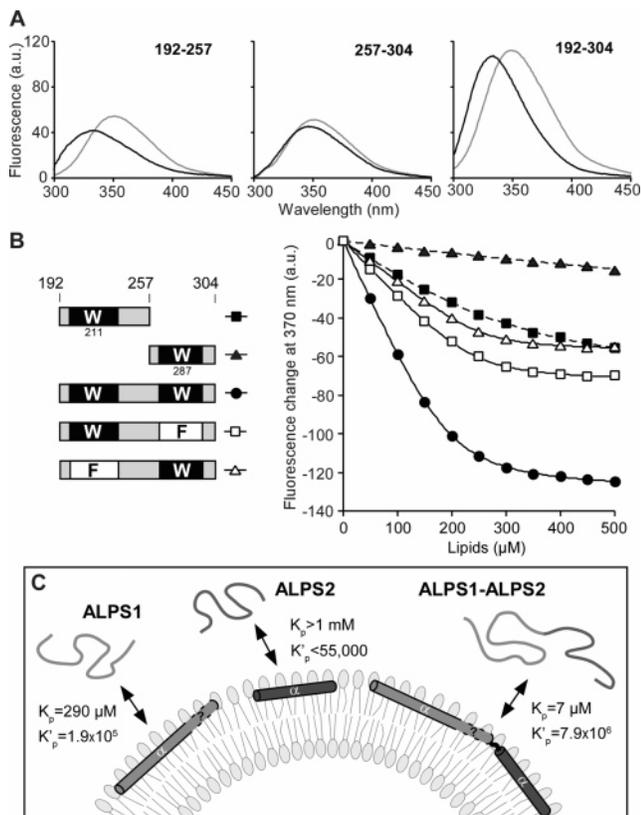


FIGURE 5: Quantitative measurements of the affinity of the ALPS motifs for small liposomes by tryptophan fluorescence. (A) Fluorescence emission spectra of the ALPS1, ALPS2, and ALPS1–ALPS2 peptides ($1 \mu\text{M}$) in buffer (gray traces) and after the addition of small Golgi-mix liposomes ($500 \mu\text{M}$) obtained by sonication [$R_h = 25 \text{ nm}$] (black traces). The corresponding blank spectra (buffer alone or liposomes alone) have been subtracted, and a scale factor, calculated from an experiment with tryptophan in the zwitterionic form, was applied to the spectra observed in the presence of liposomes to correct for the loss of excitation and emission light by scattering. (B) Corrected fluorescence change at 370 nm induced by the stepwise addition of sonicated liposomes to the indicated peptides, which are schematized at the left. The solid lines are quadratic fits, whereas the dashed lines are hyperbolic fits (see Materials and Methods). (C) Schematic view of the results. The membrane (thickness and curvature) and the helices are shown approximately to scale. The partition coefficients (K_p) have been estimated from the fits shown in panel B. K_p can be converted into K_p' , a dimensionless coefficient, which directly reflects the preference of the peptide for the liposome surface compared to the water phase.

Both W211 in ALPS1 and W287 in ALPS2 should contribute to the overall fluorescence signal observed for the ALPS1–ALPS2 peptide. To estimate their relative contribution, we prepared two mutated forms of the ALPS1–ALPS2 peptide in which either W211 or W287 was replaced with phenylalanine. We reasoned that a W to F mutation should have a minor impact on membrane adsorption but would make the corresponding ALPS motif “silent” in terms of fluorescence. Figure 5B shows that the fluorescence changes observed for the mutated ALPS1–ALPS2 peptides were approximately one-half of those observed for the wild-type form but that the shape of the dose–response curves was very similar. Quadratic fits give indeed very similar values of K_d and n . Therefore, we conclude that W211 in ALPS1 and W287 in ALPS2 contribute approximately equally to the fluorescence change observed for the ALPS1–ALPS2

peptide. Interestingly, the Phe mutants allow a better observation of the synergy between the two ALPS motifs. This can be seen by comparing the fluorescence changes observed for ALPS2 (\blacktriangle) and for the ALPS1[W211F]–ALPS2 peptide (\triangle) in Figure 5B. In both cases, W287 of the ALPS2 motif is solely responsible for the fluorescence signal, yet W287 partitions weakly in the bilayer when present in isolated ALPS2 but much more efficiently when ALPS1 was linked to ALPS2. This suggests that the partitioning of ALPS1 on lipid membranes greatly facilitates the partitioning of ALPS2. The same reasoning can be made by comparing ALPS1 with ALPS1–ALPS2[W287F] peptides.

The synergy between the two ALPS motifs was confirmed by CD spectroscopy. Titration experiments similar to that shown in Figure 2B for the individual ALPS peptides were performed with the ALPS1–ALPS2 peptide, and the results are compiled in Figure 2C (dashed line). If there was no synergy between the ALPS1 and ALPS2 motif for their folding onto small liposomes, the MRE value of the ALPS1–ALPS2 peptide should be between the values observed for the individual ALPS1 and ALPS2 peptides. In contrast, at any lipid concentration, the MRE value at 222 nm was even more negative than that observed for ALPS1, hence confirming a mutual help between the two ALPS motifs for their folding and/or adsorption at the liposome surface (Figure 2C). In the presence of 4.75 mM DOPC/DOPS sonicated liposomes, the α -helical content of the ALPS1–ALPS2 peptide was estimated to be 80% compared to 65% for ALPS1 and 36% for ALPS2.

Estimation of the Contribution of ALPS2 to the Response to Membrane Curvature. Tryptophan fluorescence is a convenient way to follow the binding of ALPS peptides to small liposomes. However, it was difficult to perform similar experiments using liposomes of larger size as they strongly scattered UV light. To circumvent this, we used an extrinsic fluorescence probe, NBD, which, like tryptophan, shows a blue shift in its emission spectrum upon moving from a polar to a nonpolar environment, but absorbs and emits in the visible spectrum where the contribution of light scattering by large liposomes is small. To attach NBD covalently, we replaced Ala236 in ALPS1 and in the ALPS1–ALPS2 peptide with a cysteine. Ala236 is at the C-terminus of the ALPS1 motif, and a NBD group at this position should experience a change in environment when the peptide adsorbs and folds at the membrane surface.

The fluorescence emission spectra of ALPS1–NBD and ALPS1–NBD–ALPS2 peptides were recorded in solution or in the presence of Golgi-mix liposomes ($600 \mu\text{M}$) of decreasing size. Figure 6 shows that when incubated with large Golgi-mix liposomes ($R_h = 120 \text{ nm}$), both peptides exhibited an emission spectrum close to that observed in solution, suggesting that they remained essentially soluble. However as the liposome size decreases, a sharp increase in NBD fluorescence was observed, further illustrating that ALPS motifs function as acute sensors of membrane curvature. Importantly, the peptides did not respond to the same range of membrane curvature: the response of the ALPS1–ALPS2 peptide to the radius of the liposomes was shifted by about $+20 \text{ nm}$ as compared to the response of the ALPS1 peptide. This suggests that the presence of ALPS2 in tandem with ALPS1 is not required for the detection of

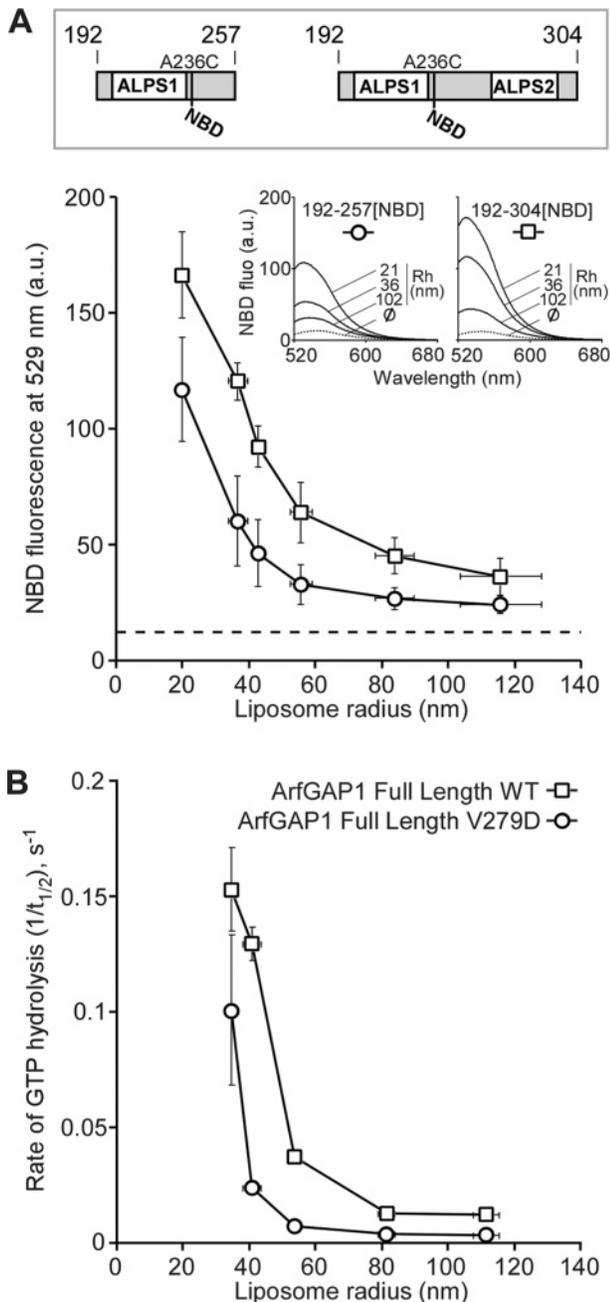


FIGURE 6: ALPS2 modulates the response of ArfGAP1 to membrane curvature. (A) NBD fluorescence assay. The constructs are schematized. The insets show typical emission spectra of NBD-labeled ALPS1 and ALPS1–ALPS2 peptides in solution (dashed curves) or in the presence of Golgi-mix liposomes of a defined radius. The fluorescence intensity at 529 nm was plotted as a function of liposome radius. The data shown are from five independent experiments. The horizontal and vertical bars show the standard deviation of the liposome hydrodynamic radius and of the NBD fluorescence intensity, respectively. The horizontal dashed line indicates the fluorescence level of the NBD peptides in solution. (B) GAP assay. GTPase measurements similar to those shown in Figure 4B were performed with Golgi-mix liposomes of a defined radius and loaded with Arf1-GTP. GTP hydrolysis was initiated by the addition of 50 nM ArfGAP1 (wild-type or V279D). The half-time ($t_{1/2}$) of GTP hydrolysis was determined graphically from the tryptophan fluorescence decay. The plot shows the rate ($1/t_{1/2}$) \pm the variation of GTP hydrolysis as a function of liposome radius for two independent experiments.

membrane curvature per se but tunes this detection toward larger radii (lower level of curvature).

We compared the results of the NBD fluorescence assay with GAP activity measurements performed with the wild-type form of ArfGAP1 and with the V279D mutant. As this mutation abolished the binding and/or folding of the isolated ALPS2 motif (Figure 2), a mutant bearing this mutation should rely only on ALPS1 for its interaction with lipid membranes, and its behavior in the GAP assay was thus expected to match the behavior of the ALPS1 peptide in the NBD fluorescence assay. In contrast, the sensitivity to membrane curvature of wild-type ArfGAP1, with two functional ALPS motifs, should better fit with the behavior of the ALPS1–ALPS2 peptide in the NBD fluorescence assay. Figure 6B reports the rate of Arf1-GTP hydrolysis catalyzed by wild-type ArfGAP1 or by the V279D mutant on Golgi-mix liposomes with various radii. Clearly and as expected, the V279D mutation does not abolish the sensitivity to membrane curvature but shifts the response to shorter radii. Thus, one can estimate that when the ALPS2 motif is made nonfunctional by the V279D mutation, the threshold for the response of the GAP activity to membrane curvature is shifted to an R of ≈ 60 nm, compared to an R of ≈ 80 nm for the wild-type form. Taken together, the NBD fluorescence assay and the GAP assay suggest that the engagement of two ALPS motifs versus one determines the range of curvature at which ArfGAP1 responds. It should be noted, however, that the response of full-length ArfGAP1 to membrane curvature (as judged from the GAP assay) was even sharper than that observed for the ALPS1–ALPS2 peptide measured by the NBD fluorescence assay. As proposed for other members of the ArfGAP family (26), intramolecular interactions within the entire ArfGAP1 molecule affecting the availability of the ALPS motifs and/or the activity of the catalytic Zn-finger fold could explain this difference.

Adaptation to Lipid Membranes with Different Lipid Compositions. ArfGAP1 is sensitive not only to membrane curvature but also to the geometry of lipids (11–13, 19). This dual sensitivity has the same cause: the ALPS motifs adsorb preferentially on membranes that display defects in lipid packing because such defects facilitate the insertion of hydrophobic residues. Therefore, a conical lipid in a flat membrane is somehow equivalent to a cylindrical lipid in the outer leaflet of a curved membrane: the mismatch between the lipid geometry and the actual curvature of the membrane leaves some space for the insertion of hydrophobic residues. We reasoned that depending on the lipid composition and notably the average level of acyl chain unsaturation, there could be an advantage of having one or two functional ALPS motifs. The ALPS1 motif may be sufficient for detection of a change in curvature of membranes with a high level of acyl chain unsaturation, whereas two functional ALPS motifs may be required for detection of a similar change for membranes with a low level of unsaturated lipids.

To test this hypothesis, we replaced a fraction (30%) of the most abundant lipids in our liposome formulation (egg PC and liver PE) with synthetic dioleoyl species (C18:1/C18:1/PC and C18:1/C18:1/PE) and used the GAP activity assay to evaluate the response of ArfGAP1 to membrane curvature. As expected, the incorporation of dioleoyl lipids shifted the membrane curvature response toward larger liposome radii. As a result, the response to membrane curvature of the V279D mutant, in which only ALPS1 is

functional, resembles that of the wild-type form in the presence of classical Golgi-mix liposomes.

DISCUSSION

We have shown that mammalian ArfGAP1 contains a second motif, ALPS2, similar in terms of physical chemistry to the previously identified ALPS1 motif. Both motifs are intrinsically unstructured but fold in a synergic manner into amphipathic α -helices at the surface of curved membranes (Figure 2). They differ from classical membrane-adsorbing α -helices by the abundance of S/T residues in the polar face (Figure 1), a feature that explains their preference for membranes with packing defects such as those induced by membrane curvature (G. Drin, personal communication). Although the sharp response of ArfGAP1 to membrane curvature is primary due to the folding and/or adsorption of the ALPS1 motif, our results suggest that the combinatory use of two ALPS motifs tunes the range of curvature at which ArfGAP1 responds and/or adapts ArfGAP1 to membranes of various lipid compositions.

ALPS2 displays less avidity for highly curved lipid membranes than ALPS1 does (Figures 2 and 5). Although the physical chemistry of the two motifs seems similar (Figure 1), subtle differences may explain this observation. First, bulky hydrophobic residues (e.g., W, L, and I) are more abundant in the nonpolar face of ALPS1 than in the cognate face of ALPS2, which contains five Val residues (Figure 1C). Second, the ALPS1 motif may be longer than ALPS2. In the helical-wheel representations shown in Figure 1C, we assume that ALPS1 spans residues 199–234. These limits were suggested by a sequence alignment with the yeast homologue Gcs1p (16). However, the C-terminus of ALPS1 may extend beyond residue 234. First, the sequence between residues 235 and 251 of ArfGAP1, although not as hydrophobic as the sequence of residues 199–234, keeps a reasonable amphipathic character and is rich in S/T residues (Figure 1B). Second, we noticed previously that the fragment of residues 192–257 displays more robust liposome binding than the fragment of residues 192–231 (16). Last, at a saturating concentration of small liposomes, the level of helical structure of the peptide of residues 192–304 estimated by CD measurements is $\sim 80\%$, corresponding to 90 amino acids (Figure 2C), which is more than the sum of the length of the ALPS1 and ALPS2 sequences suggested in Figure 1 (36 and 32 residues, respectively).

Whatever the exact C-terminus of ALPS1, it is likely that there is some structural discontinuity between ALPS1 and ALPS2. Indeed, a continuous straight α -helix consisting of ALPS1 and ALPS2 seems to be ruled out since it could not interact with a curved membrane all along its length. Kinks are required to accommodate the curvature of the membrane, and this could be the role of a Pro residue (P254) between the two motifs, which should interrupt or at least distort the helical conformation locally. In addition, the sequence around this proline is not “in phase” with the proposed ALPS α -helices, since a continuous α -helix would put negatively charged residues such as E257 and E261 in the nonpolar face. In the future, additional mutations and structural approaches such as NMR or site-directed spin labeling combined with electron paramagnetic resonance spectroscopy will be required to gain a precise picture of the membrane-

bound conformation of the entire ALPS1–ALPS2 region and to better define the boundaries of the ALPS motifs. Such approaches have been successfully applied to α -synuclein, a small presynaptic protein, whose misfolding is associated with Parkinson’s disease. Interestingly, α -synuclein also binds preferentially to highly curved membranes through the adsorption and folding of its first 90 amino acids into a structure composed of two α -helices joined by a flexible tether (27–30).

Several lines of evidence suggest a synergy between the two ALPS motifs for their folding and adsorption onto highly curved liposomes. First, the ALPS1–ALPS2 peptide binds to small liposomes and adopts an α -helical conformation much more readily than the individual motifs (Figures 2C and 5). Second, whereas the introduction of a membrane repulsive charge in a single ALPS motif results in a modest decrease in the activity of full-length ArfGAP1, the combination of two mutations, one in each motif, leads to a more severe inhibition (Figure 4B). As explained above, it is unlikely that the two ALPS motifs form a single continuous helix, and therefore, it is hard to imagine how the folding of one motif could propagate up to the second motif. Thus, the apparent synergy between the two ALPS motifs for their folding and adsorption onto curved membranes probably results from a reduction of dimensionality, an effect that applies to many membrane-binding modules (22). When one ALPS motif binds, the neighboring ALPS motif is confined in the vicinity of the membrane and therefore experiences a much higher lipid concentration as compared to an isolated ALPS motif. Therefore, even if the intrinsic avidity of ALPS2 for a curved lipid membrane is low, this is sufficient to drive strong binding, provided that ALPS1 is already bound.

What could be the advantage of having two ALPS motifs versus one? This issue is not obvious considering the fact that ArfGAP1 remains highly sensitive to membrane curvature when the ALPS2 motif is entirely deleted, such as in the construct of residues 1–257 (16) or when it is made nonfunctional by the highly perturbing V279D mutation (Figures 6B and 7). Moreover, several proteins of the ArfGAP1 subfamily lack the ALPS2 motif. The yeast homologue of ArfGAP1, Gcs1p, contains a region homologous to ALPS1 but not to ALPS2 (16). In mammals, an abundant isoform of ArfGAP1 has been found in the brain, which differs from the original ArfGAP1 protein by a large deletion in the ALPS2 motif ($\Delta 259$ –280) and by an insertion of 10 residues downstream from the ALPS1 motif (18). One intriguing model, is suggested by the activity measurements shown in Figure 7: changing the number (or length) of the ALPS motifs could be a way for ArfGAP1 to adapt to the lipid composition of membranes. The response of ArfGAP1 to membrane curvature is very sharp as decreasing the diameter of Golgi-like liposomes from 80 to 40 nm results in a 20-fold increase in the activity of wild-type ArfGAP1 (Figure 6B). During the budding of a COPI-coated vesicle, such an almost all-or-none response should be advantageous, as Arf1 molecules would be lost by GTP hydrolysis only when membrane curvature has reached a given threshold. This threshold can be considered as the morphological limit between a young and shallow bud, for which coat stability would be compromised if too many Arf molecules were lost, and a mature bud, more curved and ready for fission, for which coat disassembly must be programmed. However, the

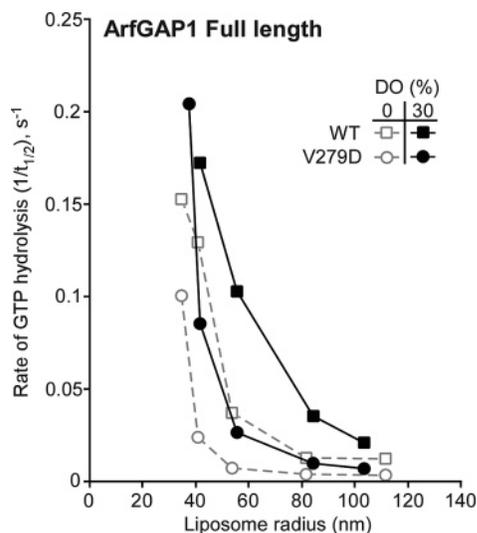


FIGURE 7: Changing the average acyl chain composition of the membrane shifts the response of ArfGAP1 to membrane curvature. GAP experiments similar to those shown in Figure 6B were performed with wild-type ArfGAP1 or with the V279D mutant on Golgi-mix liposomes in which a fraction (30 mol %) of egg PC and liver PE was replaced with dioleoyl lipids. For comparison, the results from Figure 6 with the standard Golgi-mix composition are shown in gray.

very sharp response of ArfGAP1 to membrane curvature is also highly dependent on the lipid composition (Figure 7) (11, 16, 19). This is because defects in lipid packing depend on both the actual curvature of the bilayer and the lipid geometry (31). Therefore, to keep the response within a defined range of curvature (say between 80 and 40 nm), the adsorption energy of ArfGAP1 has to be adjusted according to the lipid composition of the membrane and notably to the ratio between conical and nonconical lipids. As this ratio differs not only between organisms but also between tissues (e.g., the brain contains more unsaturated lipids than the liver), the existence of tissue-specific ArfGAP1 isoforms that differ essentially by the length and number of functional ALPS motifs (18) could be a way to adapt to different lipid environments.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Sonia Paris and Marc Chabre for comments on the manuscript, Anna Parnis and Jean-François Casella for help with some experiments, and Nathalie Leroudier and Sabine Scarzello for DNA sequencing and mass spectroscopy analysis.

REFERENCES

- Rothman, J. E., and Wieland, F. T. (1996) Protein sorting by transport vesicles, *Science* 272, 227–234.
- Lee, M. C., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L., and Schekman, R. (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 87–123.
- McMahon, H. T., and Mills, I. G. (2004) COP and clathrin-coated vesicle budding: Different pathways, common approaches, *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 379–391.
- Antonny, B. (2006) Membrane deformation by protein coats, *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 386–394.
- Nie, Z., and Randazzo, P. A. (2006) Arf GAPs and membrane traffic, *J. Cell Sci.* 119, 1203–1211.
- Goldberg, J. (1999) Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatomer in GTP hydrolysis, *Cell* 96, 893–902.

- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M., and Duden, R. (2000) COP I domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP, *EMBO J.* 19, 3905–3917.
- Lee, S. Y., Yang, J. S., Hong, W., Premont, R. T., and Hsu, V. W. (2005) ARFGAP1 plays a central role in coupling COPI cargo sorting with vesicle formation, *J. Cell Biol.* 168, 281–290.
- Aoe, T., Huber, I., Vasudevan, C., Watkins, S. C., Romero, G., Cassel, D., and Hsu, V. W. (1999) The KDEL receptor regulates a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor 1 by interacting with its non-catalytic domain, *J. Biol. Chem.* 274, 20545–20549.
- Rein, U., Andag, U., Duden, R., Schmitt, H. D., and Spang, A. (2002) ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat, *J. Cell Biol.* 157, 395–404.
- Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M., and Cassel, D. (1997) Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols, *J. Biol. Chem.* 272, 30848–30851.
- Wong, T. A., Fair, G. D., Poon, P. P., Shmulevitz, M., McMaster, C. R., Singer, R. A., and Johnston, G. C. (2005) Membrane metabolism mediated by Sec14 family members influences Arf GTPase activating protein activity for transport from the trans-Golgi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 12777–12782.
- Yanagisawa, L. L., Marchena, J., Xie, Z., Li, X., Poon, P. P., Singer, R. A., Johnston, G. C., Randazzo, P. A., and Bankaitis, V. A. (2002) Activity of specific lipid-regulated ADP ribosylation factor-GTPase-activating proteins is required for Sec14p-dependent Golgi secretory function in yeast, *Mol. Biol. Cell* 13, 2193–2206.
- Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M., and Cassel, D. (1995) The ARF1 GTPase-activating protein: Zinc finger motif and Golgi complex localization, *Science* 270, 1999–2002.
- Liu, W., Duden, R., Phair, R. D., and Lippincott-Schwartz, J. (2005) ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells, *J. Cell Biol.* 168, 1053–1063.
- Bigay, J., Casella, J. F., Drin, G., Mesmin, B., and Antonny, B. (2005) ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif, *EMBO J.* 24, 2244–2253.
- Yu, S., and Roth, M. G. (2002) Casein kinase I regulates membrane binding by ARF GAP1, *Mol. Biol. Cell* 13, 2559–2570.
- Parnis, A., Rawet, M., Regev, L., Barkan, B., Rotman, M., Gaitner, M., and Cassel, D. (2006) Golgi Localization Determinants in ArfGAP1 and in New Tissue-specific ArfGAP1 Isoforms, *J. Biol. Chem.* 281, 3785–3792.
- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S., and Antonny, B. (2003) Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature, *Nature* 426, 563–566.
- Bigay, J., and Antonny, B. (2005) Real-time assays for the assembly-disassembly cycle of COP coats on liposomes of defined size, *Methods Enzymol.* 404, 95–107.
- Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S., and White, S. H. (2000) How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal. Biochem.* 285, 235–245.
- Buser, C. A., Sigal, C. T., Resh, M. D., and McLaughlin, S. (1994) Membrane binding of myristylated peptides corresponding to the NH2 terminus of Src, *Biochemistry* 33, 13093–130101.
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., and Chabre, M. (1997) N-Terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange, *Biochemistry* 36, 4675–4684.
- Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, *Anal. Biochem.* 287, 252–260.
- Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T., and Mornon, J. P. (1987) Hydrophobic cluster analysis: An efficient new way to compare and analyse amino acid sequences, *FEBS Lett.* 224, 149–155.
- Che, M. M., Boja, E. S., Yoon, H. Y., Gruschus, J., Jaffe, H., Stauffer, S., Schuck, P., Fales, H. M., and Randazzo, P. A. (2005) Regulation of ASAP1 by phospholipids is dependent on the interface between the PH and Arf GAP domains, *Cell. Signalling* 17, 1276–1288.
- Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., and George, J. M. (1998) Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes, *J. Biol. Chem.* 273, 9443–9449.
- Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., and Sudhof, T. C. (2003) A broken α -helix in folded α -Synuclein, *J. Biol. Chem.* 278, 15313–15318.

29. Bisaglia, M., Tessari, I., Pinato, L., Bellanda, M., Giraudo, S., Fasano, M., Bergantino, E., Bubacco, L., and Mammi, S. (2005) A topological model of the interaction between α -synuclein and sodium dodecyl sulfate micelles, *Biochemistry* 44, 329–339.
30. Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., and Nussbaum, R. L. (2005) Structure and dynamics of micelle-bound human α -synuclein, *J. Biol. Chem.* 280, 9595–9603.
31. van den Brink-van der Laan, E., Killian, J. A., and de Kruijff, B. (2004) Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile, *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 275–288.

BI062288W

c) La sensibilité singulière des protéines ArfGAP 2 et 3

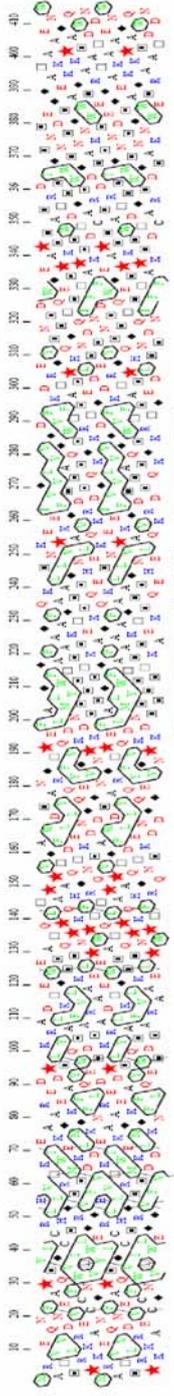
1. Introduction

Dans la levure, les deux protéines Arf GAP Gcs1p et Glo3p sont impliquées dans le transport vésiculaire COPI entre le Golgi et le RE (Dogic et al., 1999; Poon et al., 1999). Ces deux protéines ont des homologies de séquences avec les protéines de mammifère ArfGAP1 et ArfGAP2/3 respectivement. Le maintien dans l'évolution de ces deux protéines dont la fonction est a priori redondante, donne le sentiment qu'elles utilisent des mécanismes d'action divergents. Comprendre quelles sont les différences entre ArfGAP1 et ArfGAP2/3 est donc un problème important à résoudre.

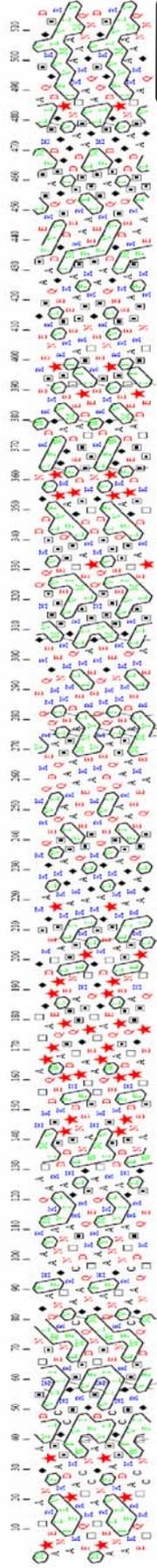
Les expériences de génétique de levures menées sur *gcs1* et *glo3* indiquent que la délétion d'un seul des deux gènes ne compromet pas leur viabilité, mais qu'en revanche la double délétion est létale. Malgré la redondance apparente de leur fonction, les simples mutants pour l'une ou l'autre de ces protéines ne se comportent pas de la même façon : Le simple mutant *gcs1*Δ croît à une vitesse normale et ne montre que des défauts de transport mineurs. Par contre, la croissance de *glo3*Δ est plus lente, et les levures accusent de problèmes sérieux dans le transport. D'autre part, la combinaison de la mutation *glo3*Δ avec une mutation affectant la sous-unité γ -COP (*sec21-1 glo3*Δ) est létale, alors que les levures portant la double mutation *sec21-1 gcs1*Δ sont viables à température permissive (Poon et al., 1999). Enfin, le remplacement de *glo3* par un mutant inactif pour sa fonction GAP (*glo3*-R59K), bloque le transport rétrograde en interférant sur la fonction de 'sauvetage' de *gcs1*. Ce n'est que la surexpression de Gcs1p qui rend les levures viables dans ces conditions (Lewis et al., 2004). Tout ceci indique clairement que la contribution de la protéine Glo3p dans le transport vésiculaire COPI est plus forte que celle de Gcs1p. De façon importante, il existe une interaction directe entre Glo3p et les sous-unités du coatome Sec21p (γ -COP) et Sec27p (β' -COP), ce qui n'est pas le cas pour Gcs1p (Eugster et al., 2000; Lewis et al., 2004). D'autre part, l'activité GAP de Glo3p, mesurée sur Arf1-GTP ancré sur des membranes golgiennes, semble dépendante du coatome (Szafer et al., 2001). L'ensemble de ces données suggère que, contrairement à Gcs1p, la fonction de Glo3p est étroitement liée au coatome.

Récemment, une étude a révélé l'existence d'une région dans la protéine Glo3p (appelée 'motif Glo3'), nécessaire pour sa fonction (Yahara et al., 2006). Ce motif se situe dans la partie non catalytique de la protéine, tout proche du C-terminal ; il s'agit d'une région centrée sur deux séquences ISSxxxFG répétées. Cette région est conservée chez les protéines

ArfGAP1



ArfGAP2



ArfGAP3

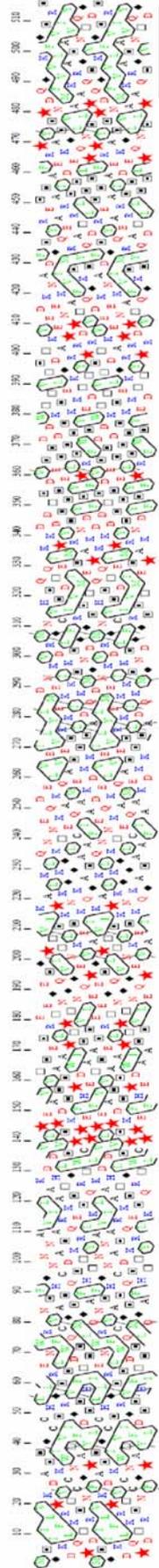


Figure 57 : Séquence HCA des protéines ArfGAP1, 2 et 3. La partie non catalytique des protéines ArfGAP2 et 3 ne semble pas comporter de motif ALPS, en revanche les extrémités C-terminales de ces protéines portent les caractéristiques de grandes hélices amphipathiques.

eucaryotes de la famille Glo3, mais est absente chez celles de la famille Gcs1. Les auteurs utilisent un mutant thermosensible d'*arf1* (*arf1-16*) létal, dont l'effet est supprimé par la surexpression de la protéine Glo3p. Ils montrent qu'en remplaçant les résidus de ces deux séquences ISSxxxFG en alanines, Glo3p ne parvient plus à supprimer le phénotype de *arf1-16*. Ce motif est donc requis pour que Glo3p soit fonctionnel.

ArfGAP2 et ArfGAP3 sont deux orthologues de mammifère de la protéine Glo3p. Ces protéines, de 521 et 516 acides aminés respectivement, possèdent une identité de séquence entre elles de 49,6%. ArfGAP2 et ArfGAP3 se localisent dans le complexe golgien et dans le réseau tubulo-vésiculaire entre le RE et le Golgi (ERGIC), mais sont absentes du TGN (Frigerio et al., 2007). Comme Glo3p, ces protéines s'associent aux vésicules recouvertes de manteau COPI en présence de GTP γ S. Par ailleurs, une interaction directe entre le coatomer et la partie non catalytique des protéines Glo3p et ArfGAP2 a été observée. Curieusement, la surexpression dans les cellules de mammifères du domaine appendice de γ -COP redistribue ArfGAP2 dans le cytoplasme, mais non ArfGAP3. Il semble en effet que l'interaction entre cette sous-unité du manteau et ArfGAP2 soit beaucoup plus efficace qu'avec ArfGAP3 (Watson et al., 2004). De plus, la protéine ArfGAP2 surexprimée sans son domaine catalytique agit comme dominant négatif et bloque le transport entre le Golgi et le RE. Des travaux récents révèlent plus précisément que la protéine ArfGAP2 se lie à la sous-unité γ_1 -COP, alors que ArfGAP3 préfère se lier à γ_2 -COP (Moelleken, 2005). Toutes ces données indiquent que ArfGAP2 et ArfGAP3 sont directement impliqués dans le transport vésiculaire COPI. D'autre part, l'invalidation (ou du moins l'atténuation) par siRNA d'ArfGAP1, ou de la combinaison d'ArfGAP2 et ArfGAP3, ne diminue pas la viabilité cellulaire, indiquant une redondance dans leur fonction. En effet, il faut invalider simultanément les trois ArfGAPs pour parvenir à la mort des cellules (Frigerio et al., 2007).

2. Résultats

L'ensemble des travaux sur Glo3p et sur ArfGAP2 et 3 montre que ces protéines ont un rôle spécifiquement associé au manteau COPI dans la cellule. La redondance de ces protéines avec Gcs1 et ArfGAP1 respectivement, comme le suggère le phénotype de létalité synthétique, indique pourtant que ces protéines partagent au moins une fonction essentielle dans la cellule. Certes, l'activité GAP sur Arf1 est bien portée par chacune de ces protéines, mais beaucoup de questions se posent alors. Comment intégrer ces deux ArfGAPs golgiennes dans le contrôle de la dissociation du manteau COPI, déjà si bien orchestré par ArfGAP1 ?

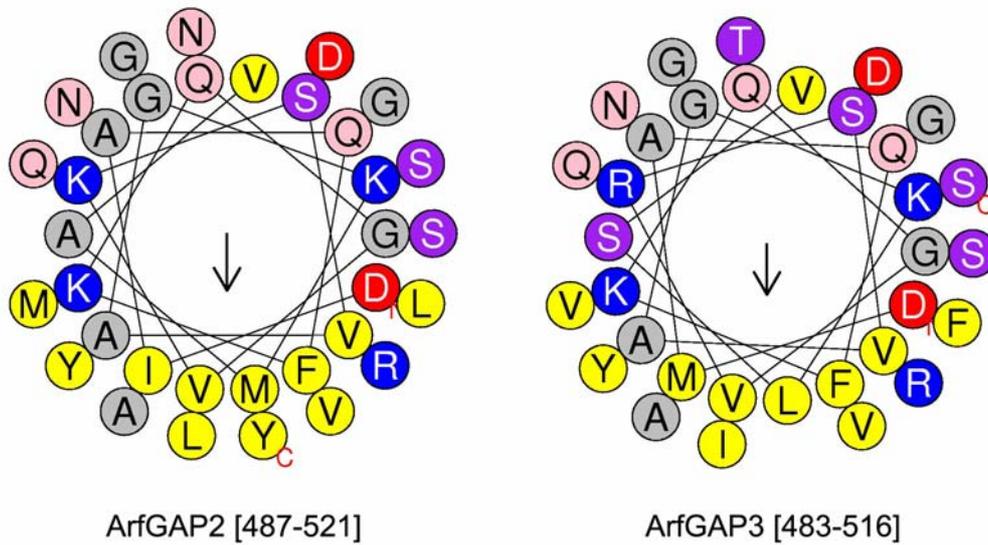


Figure 58 : Représentation en hélices α des extrémités C-terminales des protéines ArfGAP2 et ArfGAP3.

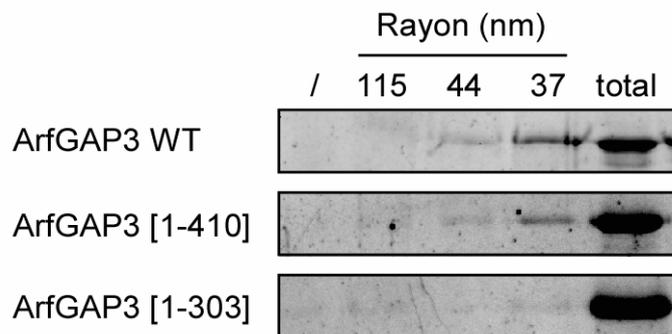


Figure 59 : Expérience de flottaison. La liaison membranaire d'ArfGAP3 ainsi que des mutants de délétion 1-410 et 1-303 est mesurée sur des liposomes de différents rayons. ArfGAP3 se lie de manière courbure dépendante aux liposomes. La construction 1-410 interagit moins bien avec les liposomes, et 1-303 perd toute propriété de liaison.

Existe-t-il, comme pour ArfGAP1, une régulation spatio-temporelle de leur activité GTPase, de manière à 'protéger' l'assemblage du manteau COPI ? Finalement, peut-on attribuer à chacune de ces ArfGAPs un rôle distinct dans le Golgi ?

Comparons d'abord les séquences des protéines ArfGAP2 et ArfGAP3 avec celle d'ArfGAP1 par leur représentation HCA (figure 57). Les parties non catalytiques des protéines ArfGAP2 et 3, très similaires, ne semblent pas posséder de motif de type ALPS. En revanche, ces protéines portent une séquence sur leur extrémité C-terminale qui est caractéristique d'une longue hélice amphipathique (figure 58). Cette hélice qui s'étend sur plus de 20 résidus, juste derrière leur motif 'Glo3', est pauvre en sérine et thréonine et possède des résidus chargés basiques sur ses 'ailes', excluant le fait que ce soit un motif ALPS. A part cette hélice présumée, ArfGAP2 et 3 ne présentent pas d'autres signes évidents de structure secondaire dans leur partie non catalytique. Notons toutefois l'existence de plusieurs régions riches en résidus hydrophobes dans ces protéines, qui malgré une ambiguïté certaine, pourraient se replier en hélices amphipathiques.

ArfGAP2 et ArfGAP3 se ressemblent et ne présentent que des divergences subtiles, de ce fait, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la protéine ArfGAP3, plus proche de Glo3p et jusqu'à présent plus étudiée. ArfGAP3 est très sensible à la protéolyse ménagée, ce qui suggère que cette protéine possède de grandes régions non structurées, comme ArfGAP1. Afin de déterminer si ArfGAP3 peut se lier sur des membranes lipidiques, et pourquoi pas reconnaître la courbure membranaire, nous avons d'abord mesuré son adsorption sur des liposomes de différents rayons (figure 59). De manière inattendue, ArfGAP3 se lie aux membranes et montre une sensibilité à la courbure membranaire. Notons toutefois que cette liaison est nettement plus faible que celle observée avec ArfGAP1. Pour définir quelle partie de la protéine est impliquée dans cette liaison membranaire, nous avons créé deux constructions d'ArfGAP3. La construction [1-410], dépourvue de la grande hélice amphipathique C-terminale supposée, ainsi que du motif Glo3 ; et la construction [1-310] où il manque en plus certaines régions hydrophobes/amphiphiles. Les expériences de flottaison indiquent que [1-410] montre encore des signes de liaison membranaire, mais la délétion de l'extrémité C-terminale de la protéine réduit fortement son adsorption membranaire. En revanche, on ne discerne plus de liaison de la construction [1-303] sur les liposomes, elle reste totalement soluble. L'extrémité C-terminale de la protéine ArfGAP3 serait donc impliquée dans sa liaison membranaire. Nos résultats suggèrent que l'hélice C-terminale agit conjointement avec une autre région de la protéine pour permettre la liaison d'ArfGAP3.

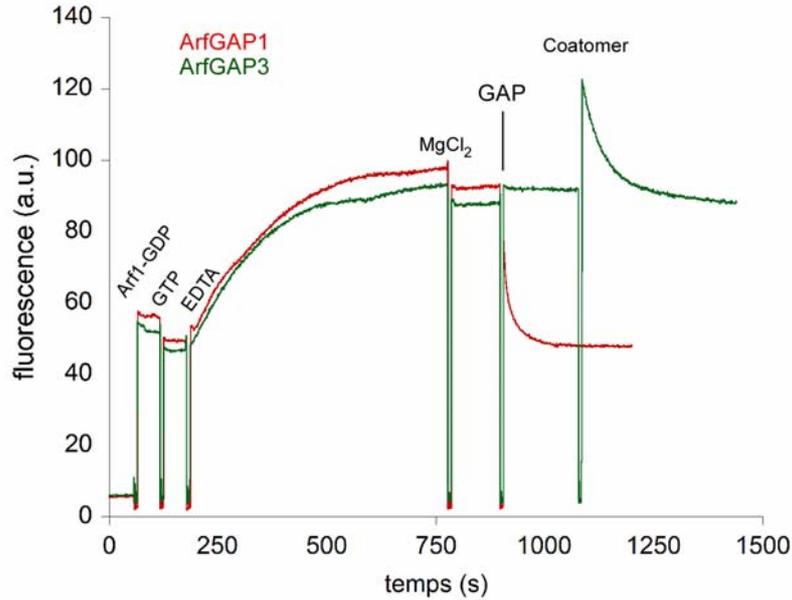


Figure 60 : L'activité d'hydrolyse du GTP d'Arf1 par AfGAP3 est strictement dépendante du coatomer. La fluorescence des tryptophanes d'Arf1 est mesurée. Arf1 myristoylé ($1\mu\text{M}$) est lié sur des liposomes ($R_h = 36\text{nm}$) de type Golgi-mix supplémentés en lipopeptide lp23. Les ArfGAPs sont utilisés à 25nM . Le coatomer est ajouté en quantité catalytique : 25nM . ArfGAP3 seul n'a aucun effet sur Arf1-GTP ; en revanche, son activité est révélée par la présence du coatomer.

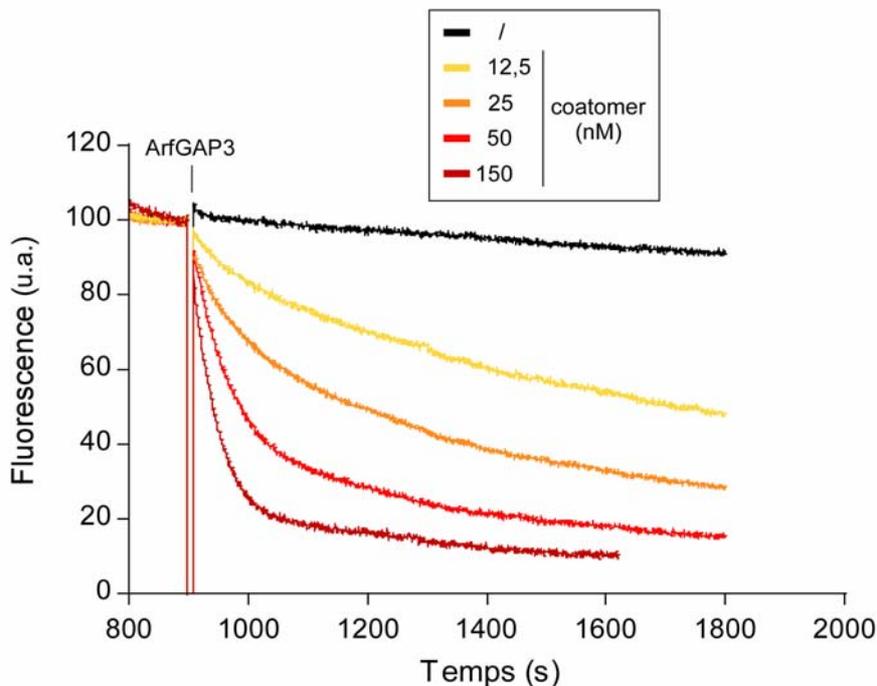


Figure 61 : L'activité d'AfGAP3 augmente de manière dose dépendante avec le coatomer. ArfGAP1 est utilisé ici à 25nM . Arf1 myristoylé ($1\mu\text{M}$) est préalablement chargé sur des liposomes de taille intermédiaire ($0,2\text{mM}$). Le coatomer est incubé avec les liposomes en début d'expérience.

Toutefois, cette liaison membranaire est faible, et de ce fait, peut ne pas être significative dans le contexte cellulaire. Ceci nous conduit à examiner l'activité GTPase de la protéine ArfGAP3 sur la protéine Arf1-GTP membranaire.

Afin de mesurer l'activité catalytique d'ArfGAP3 sur la protéine Arf1-GTP ancrée sur des liposomes, nous avons utilisé l'expérience spectroscopique dans laquelle la transition GTP/GDP d'Arf1 est suivie par la fluorescence des tryptophanes. De manière inattendue, en ayant recours aux conditions classiquement utilisées pour mesurer l'activité d'ArfGAP1 sur Arf1 lié aux liposomes, aucune activité d'ArfGAP3 n'est observée. Par ailleurs, cette activité reste nulle quelque soit la taille des liposomes utilisés. En revanche, l'addition de coatomer en quantité catalytique révèle l'activité GAP (figure 60). L'activité d'ArfGAP3 est donc strictement dépendante de la présence du coatomer. Dans ces expériences, les liposomes sont supplémentés par du lipopeptide p23 (lp23), qui mime l'extrémité cytosolique de p23, la protéine transmembranaire récepteur de cargo, connue pour favoriser la liaison membranaire du coatomer. Notons que le lp23 seul n'a aucun effet sur l'activité d'ArfGAP3. Nous démontrons, d'autre part, que l'activité d'ArfGAP3 augmente de manière dose dépendante avec le coatomer (figure 61). Les constructions d'ArfGAP3 plus courtes, [1-410] et [1-303], montrent par contre des cinétiques d'hydrolyse du GTP plus lentes que la protéine entière, suggérant probablement un rôle de la partie C-terminale dans ces événements. Donc, ces premiers résultats sous-entendent qu'une interaction directe entre le coatomer et ArfGAP3 soit nécessaire pour son activité. De plus, cette interaction pourrait impliquer la partie délétée dans les constructions d'ArfGAP3 puisque leur activité en présence de coatomer est réduite.

De façon remarquable, lorsque le coatomer est présent, nous montrons que l'activité d'ArfGAP3 'retrouve' une sensibilité à la courbure membranaire. En effet, dans ces conditions, l'hydrolyse du GTP d'Arf1 par ArfGAP3 est plus rapide lorsque Arf1-GTP est attaché sur des petits liposomes plutôt que sur des gros (figure 62). Afin de comprendre cette sensibilité, nous avons voulu vérifier si la courbure membranaire pouvait directement influencer la vitesse de désassemblage du manteau par ArfGAP3. De manière surprenante, nos résultats indiquent que la vitesse de désassemblage du manteau, estimée par diffusion de lumière, n'est pas sensible à la courbure membranaire (figure 63). Notons que cette technique demande une quantité de coatomer non catalytique, pour recouvrir les membranes de manteau. L'explication la plus plausible pour décrire ce phénomène est que la concentration en manteau à la surface des liposomes n'est pas la même dans les deux expériences. Dans

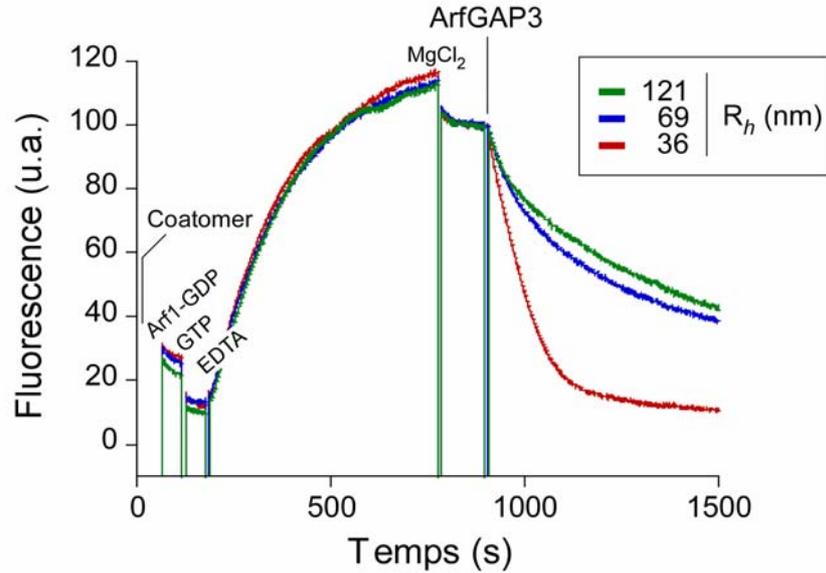


Figure 62 : L'activité d'ArfGAP3 (25 nM) en présence de coatamer (25 nM) semble dépendre de la courbure membranaire. Des liposomes de type Golgi-mix de différents rayons, non-supplémentés en lipopeptide p23, sont incubés à 0,2 mM avec le coatamer en début d'expérience.

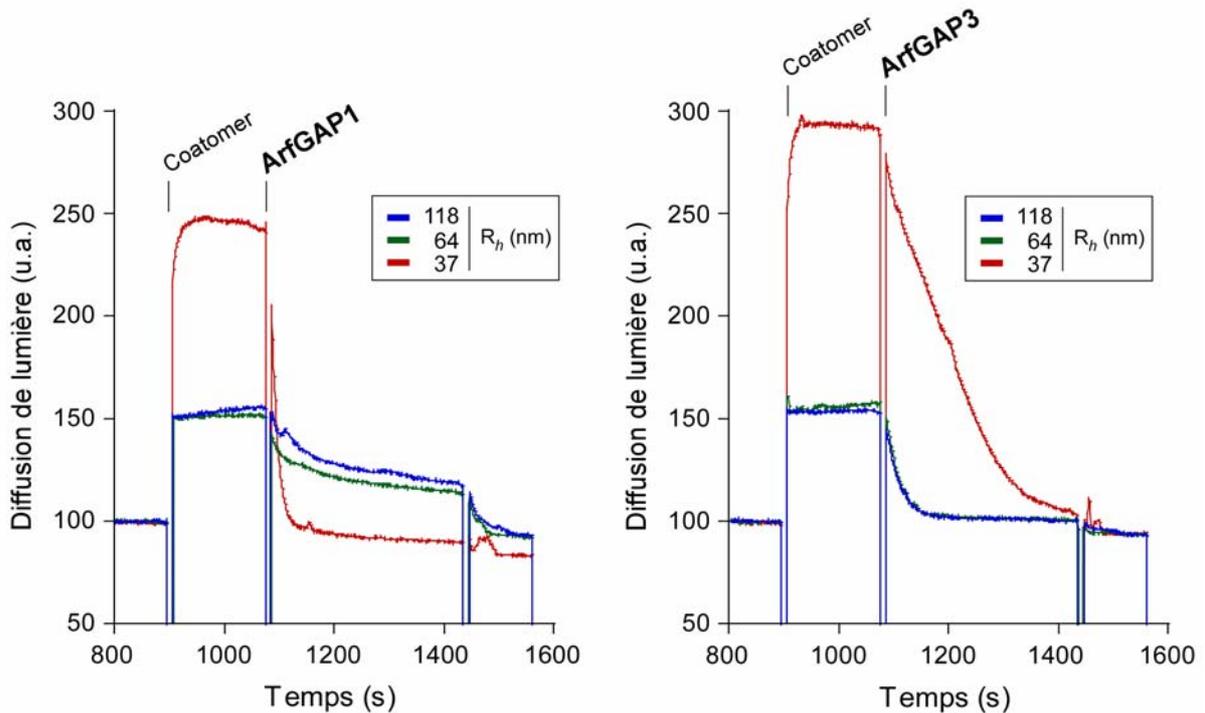


Figure 63 : Expérience de désassemblage du manteau COPI. Les liposomes Golgi-mix (0,1 mM) supplémentés en lipopeptide p23 sont préalablement chargés en Arf1-GTP (0,75 μ M). Le coatamer est utilisé à 0,3 μ M. La variation du signal de diffusion de lumière observé lors de l'assemblage du coatamer correspond probablement à une variation de l'indice de réfraction des liposomes recouverts de manteau en fonction de leur taille. La vitesse de désassemblage du manteau par ArfGAP1 (5 nM) est dépendante de la courbure membranaire. En revanche, la vitesse de dissociation du manteau est constante, quelle que soit la taille des liposomes utilisés, lorsqu'ArfGAP3 (10 nM) est ajouté.

l'expérience d'activité, la sensibilité à la courbure apparente que l'on observe vient du fait que le peu de coatomer utilisé se lie mieux et/ou se polymérise mieux sur les petits liposomes plutôt que sur les gros. Or, contrairement à ArfGAP1, ArfGAP3 est hypersensible au coatomer, de ce fait son activité est d'autant plus intense sur les petits liposomes. Cette sensibilité apparente n'est pas visible dans l'expérience de désassemblage du manteau car le coatomer, en concentration importante, se polymérise convenablement pour recouvrir chaque molécule d'Arf1 disponible, sur petits comme sur gros liposomes. En conclusion, ces expériences révèlent la sensibilité étonnante d'ArfGAP3 à l'état de polymérisation du manteau. De plus, des expériences d'hydrolyse du GTP d'Arf1 Δ 17 montrent que le coatomer n'a aucun effet sur l'activité d'ArfGAP3 en solution.

Bien que le rôle exact du lipopeptide p23 soit controversé, il est connu pour favoriser la liaison du coatomer sur des vésicules golgiennes et induire sa polymérisation (Bremser et al., 1999; Reinhard et al., 1999; Sohn et al., 1996). D'autre part, des expériences de microscopie électronique indiquent clairement une différence de morphologie des liposomes recouverts de manteau en absence ou en présence de lp23 (figure 64). En absence de lp23, ces liposomes ont l'apparence de tubes de petit diamètre (~20 nm) qui peuvent être remarquablement longs (jusqu'à 1 μ m). En revanche, en présence de lp23, il n'y a jamais de tubes, mais au contraire, un mélange de liposomes bourgeonnants et de petites vésicules. Bien qu'une explication précise à ces phénomènes manque, la présence du lipopeptide semble agir sur l'état de polymérisation du coatomer à la surface des membranes. En effet, seule la présence de lp23 permet la formation de structures organisées sphériquement à la surface de membranes plus planes. Afin de vérifier si l'état de polymérisation du manteau est un élément critique pour l'activité d'ArfGAP3 (plutôt qu'un simple effet de concentration surfacique), nous avons mesuré la vitesse de dissociation du manteau par ArfGAP3 sur des liposomes supplémentés ou non par le lp23 (figure 65). Nos résultats montrent que la présence de lp23 augmente fortement la vitesse de désassemblage du manteau par ArfGAP3, confirmant sa sensibilité à l'état de polymérisation du manteau COPI.

En conclusion, un parallèle intéressant peut être observé entre les protéines ArfGAP1 et ArfGAP3, dans le contexte du bourgeonnement vésiculaire COPI. L'extrême sensibilité d'ArfGAP1 pour les défauts de compaction lipidique permet la régulation spatio-temporelle de son activité. L'activité d'ArfGAP1 est donc couplée à la courbure membranaire induite par la polymérisation du manteau. Pour ArfGAP3, nous proposons un autre mécanisme de

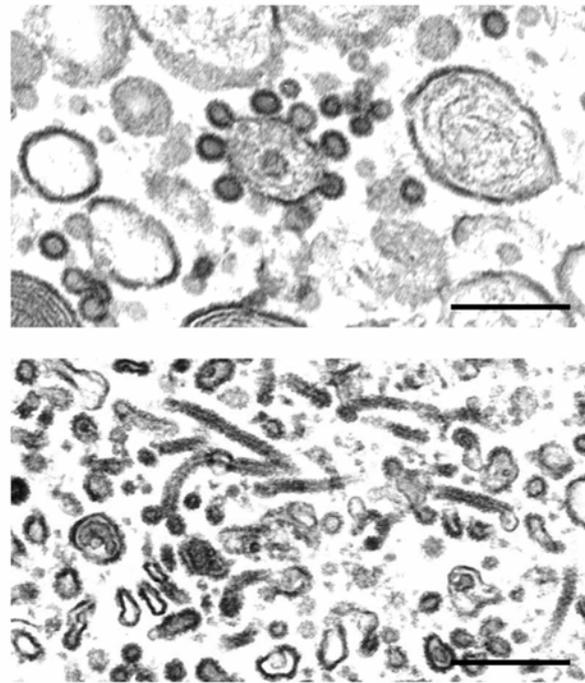


Figure 64 : Microscopie électronique. Des liposomes Golgi-mix utilisés à 1 mM sont supplémentés ou non par du lipopeptide Ip32 (2% surfacique). Arf1 myristoylé (25 μ M) est chargé sur les liposomes et le coatomer est ajouté à 5,7 μ M. En présence de lipopeptide, coexistent des gros liposomes partiellement couverts, des bourgeons et des petites vésicules. En absence de lipopeptide, les liposomes sont déformés en tubes recouverts de manteau. Notons qu'il n'y a jamais de tubes lorsque les liposomes sont supplémentés en lipopeptide. Barre : 400 nm.

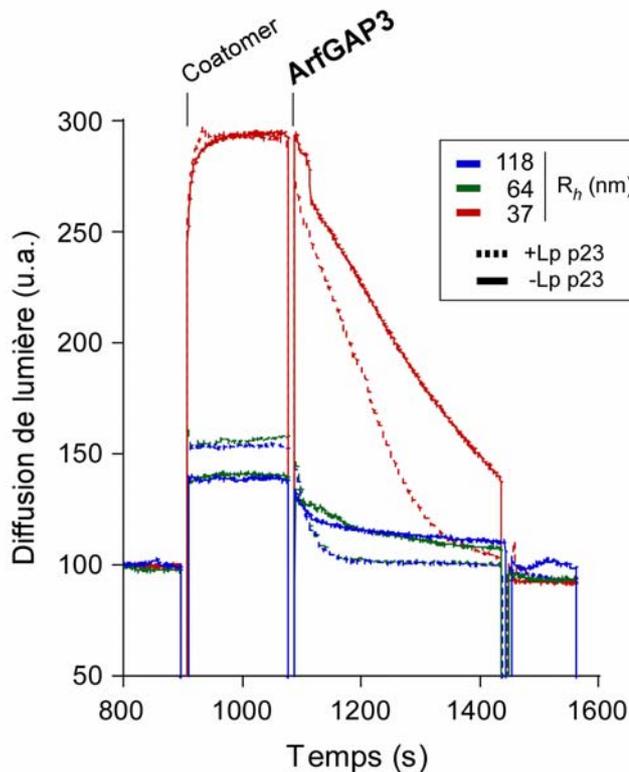


Figure 65 : Expérience de diffusion de lumière. La dissociation du manteau COPI par ArfGAP3 est accélérée en présence de lipopeptide. Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la figure 76 ; les expériences en présence de lipopeptide ont été reportées ici (en hachuré).

régulation : Son activité pourrait être régulée non pas par la courbure de la membrane, mais directement par le degré de polymérisation du manteau COPI. Ces deux mécanismes d'action ont la même conséquence : Une dissociation membranaire de la protéine Arf1-GDP efficace, dès que l'état de polymérisation du manteau le 'tolère', c'est-à-dire, dès qu'un état de métastabilité est atteint. De façon intéressante, les études portant sur les homologues des protéines ArfGAP1 et 3 dans la levure montrent que la contribution de la protéine Glo3p dans le transport vésiculaire COPI est plus forte que celle de Gcs1p. Bien qu'il existe une faible liaison membranaire d'ArfGAP3, tout comme il existe vraisemblablement une faible interaction entre ArfGAP1 et le coatomer, l'ensemble de nos résultats, soutenus par les travaux précédemment effectués dans la levure, indiquent que seule ArfGAP3 est réellement spécifique du coatomer, et donc du transport vésiculaire COPI. Par contre, l'hydrolyse du GTP d'Arf1 catalysée par ArfGAP1 n'est pas dépendante du coatomer, ce qui signifie que la fonction de cette protéine n'est pas limitée au désassemblage du manteau. En effet, la protéine Arf1 possède de nombreux effecteurs dans le Golgi, dont l'interaction ne gêne pas l'action d'ArfGAP1 (Menetrey et al., 2007). Ainsi, ArfGAP1 pourrait être amené à 'débarrasser' les bourgeons vésiculaires de divers effecteurs d'Arf1, mais également à agir sur toute autre zone golgienne de courbure membranaire importante.

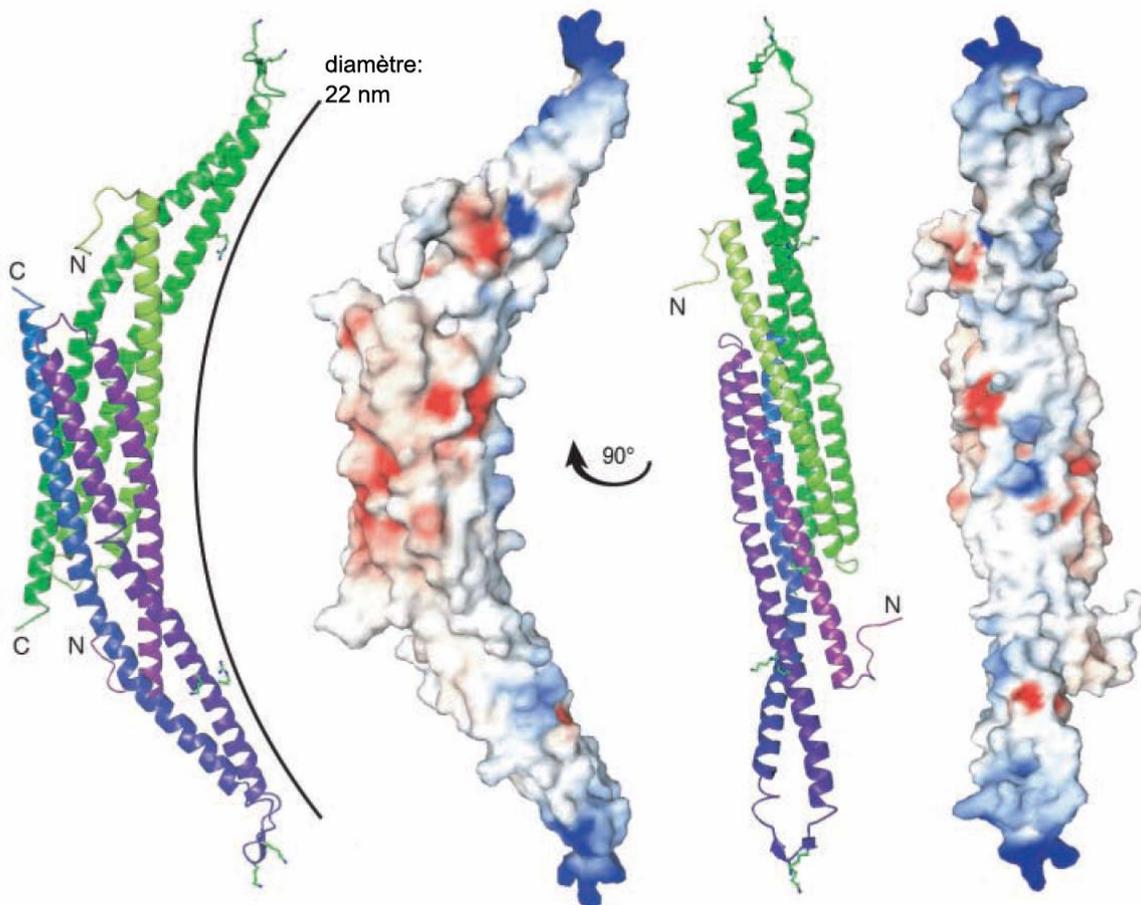


Figure 66 : Le domaine BAR de l'Amphiphysine (Peter et al., 2004). La structure en forme de banane du domaine BAR s'ajuste sur un cercle de 22 nm de diamètre. La présence de résidus basiques sur la face concave du domaine BAR suggère qu'il interagit de façon électrostatique avec les têtes polaires des lipides.

4) Discussion et conclusion

a) Domaine BAR et motif ALPS, ou sentir la courbure membranaire différemment

Intuitivement, si l'on devait dessiner un domaine protéique capable de reconnaître la courbure d'une membrane, nous aboutirions vraisemblablement à quelque chose s'approchant de la structure du domaine BAR, c'est-à-dire, un domaine très simple, ressemblant à une banane, cristallisé par McMahon et son équipe (figure 66) (Peter et al., 2004). Ce domaine BAR est issu de la dimérisation d'un domaine structuré en fagot de trois hélices α (coiled-coil), provenant de deux protéines identiques. La forme très spéciale du domaine BAR vient de la courbure propre de chacun des monomères (par la présence de prolines au milieu de certaines hélices), mais surtout du positionnement d'un monomère par rapport à l'autre, suggérant que seul le dimère est fonctionnel. Le domaine BAR est une structure rigide qui se colle à la membrane par des interactions électrostatiques auxquelles participent de nombreux résidus basiques présents sur sa face concave. En effet, des mutations de ces résidus positivement chargés en glutamates suppriment toute liaison membranaire. Ceci suggère que des phospholipides ayant une tête polaire chargée négativement, comme la phosphatidylsérine ou les phosphoinositides, sont requis pour ce type d'interaction. Des expériences de liaison sur des liposomes de différentes tailles montrent que le domaine BAR de l'Amphiphysine préfère se lier aux petits liposomes (d'un rayon de ~ 50 nm) plutôt qu'au gros (rayon de ~ 300 nm), c'est donc un senseur de courbure membranaire.

De façon intéressante, certains domaines BAR possèdent une propriété supplémentaire intéressante : Ils comportent une hélice amphipathique additionnelle en N-terminal d'une trentaine de résidus (N-BAR), ou encore une 'crête' hydrophobe dépassant de leur face concave, leur permettant d'affermir leur liaison membranaire en s'insérer entre les lipides. Ces domaines BAR 'fort' sont capables d'induire et de stabiliser la courbure sur une membrane (Gallop and McMahon, 2005; Masuda et al., 2006). Ainsi, les domaines BAR de l'Amphiphysine ou de l'Endophiline entraînent la tubulation de gros liposomes, et la tubulation de membranes cellulaires lorsque la protéine y est surexprimée (Farsad et al., 2001; Lee et al., 2002; Takei et al., 1999). En fait, l'insertion d'une hélice amphipathique ou d'une portion hydrophobe de la protéine dans le feuillet membranaire qui lui fait face, agit comme un 'coin' et écarte les lipides. De ce fait, ceci engendre un déséquilibre surfacique qui cause la courbure membranaire (figure 67).

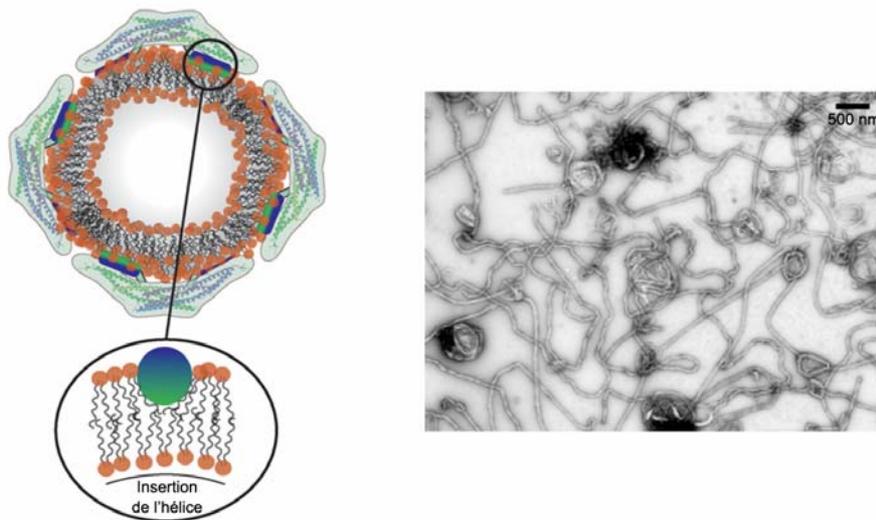


Figure 67 : Les domaines BAR ‘forts’ induisent la courbure membranaire. L’insertion de l’hélice amphipathique N-terminale de l’amphiphysine dans le feuillet externe de la membrane agit comme un coin et écarte les lipides, provoquant ainsi la courbure membranaire. Le cliché de microscopie électronique montre l’effet de tubulation de l’amphiphysine sur des liposomes. (D’après Gallop et al., 2005 ; Takei et al., 1999).

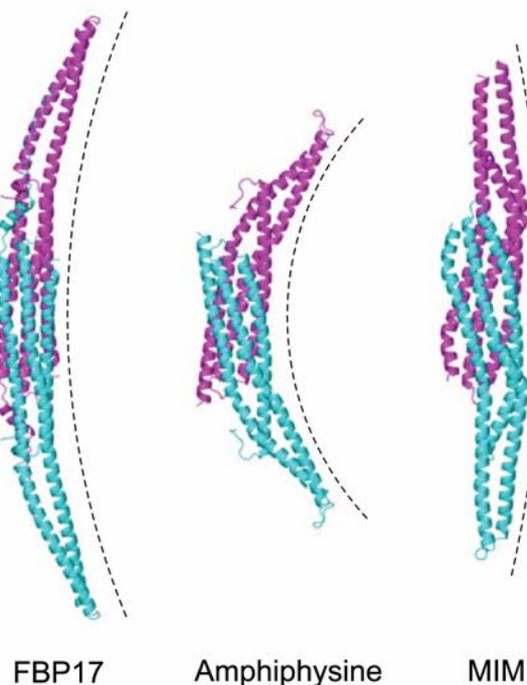


Figure 68 : Variation dans la forme des domaines BAR. La structure du domaine BAR de FBP17 s’ajuste sur un cercle de 600 Å de diamètre, celui de l’Amphiphysine sur un cercle de 220 Å de diamètre, et le domaine BAR inversé de MIM correspond à un cercle de 950 Å de diamètre.

La comparaison des structures tridimensionnelles de domaines BAR issus de différentes protéines révèle une variation considérable dans leur forme, comme si un domaine donné pouvait, par sa courbure propre, induire et/ou sentir sélectivement une courbure membranaire d'un degré particulier. Le domaine BAR de l'Amphiphysine s'adapte parfaitement à un cercle d'un diamètre de ~ 200 Å, alors que celui de FPB17 est adapté à un diamètre beaucoup plus large, de ~ 600 Å (figure 68). Une étude propose un modèle selon lequel ces deux protéines agissent séquentiellement lors des phénomènes d'endocytose à la membrane plasmique (Shimada et al., 2007). La géométrie de leur domaine paraît adaptée à différents degrés de courbure membranaire rencontrés au cours du bourgeonnement vésiculaire : FPB17 serait engagé dans les événements précoces d'invagination du bourgeon de clathrine, lorsque la courbure est encore faible, alors que l'Amphiphysine aurait une fonction dans l'étape ultime, au niveau du cou du bourgeon, qui présente une courbure très élevée, avant la fission de la vésicule. Notons aussi l'existence d'un domaine BAR très particulier, car 'inversé', présent dans les protéines MIM et IRSp53. Cette fois, les résidus basiques sont localisés sur la face convexe du domaine BAR, et peut ainsi générer une courbure négative sur les membranes (Mattila et al., 2007). Cet exemple, parmi bien d'autres, montre la correspondance précise entre la forme plus ou moins courbe d'un domaine BAR d'une protéine, et sa fonction cellulaire, étroitement liée à la morphologie membranaire locale.

Nos études montrent qu'ArfGAP1 ne possède pas de tels domaines pour sentir la courbure membranaire, mais utilise un mécanisme différent, jusque là inconnu : Des motifs non structurés en solution qui se replient en hélices α amphipathiques uniquement au contact de membranes fortement courbées : Les motifs ALPS. Contrairement au domaine BAR, le motif ALPS ne reconnaît pas la courbure de la membrane 'en soi', c'est-à-dire sa géométrie, mais les défauts de compaction lipidiques engendrés par celle-ci. Donc très clairement, motif ALPS et domaine BAR sentent la courbure membranaire, mais de manière complètement différente. En conséquence, ils pourraient ne pas être adaptés aux mêmes conditions de courbure membranaire : Le motif ALPS ne semble pas adapté à une membrane courbée dont les lipides sont fortement compactés, alors que la reconnaissance 'de surface' du domaine BAR le permet. En revanche, le domaine BAR n'interagit pas avec une membrane pauvre en lipides anioniques, alors que le motif ALPS est insensible à la charge des têtes polaires des lipides. Cette adaptation se vérifie par la répartition cellulaire presque exclusive des protéines à domaine BAR sur les membranes 'post-golgiennes', riches en lipides anioniques et dont la compaction lipidique est élevée. De plus, ALPS et BAR pourraient être adaptés à des

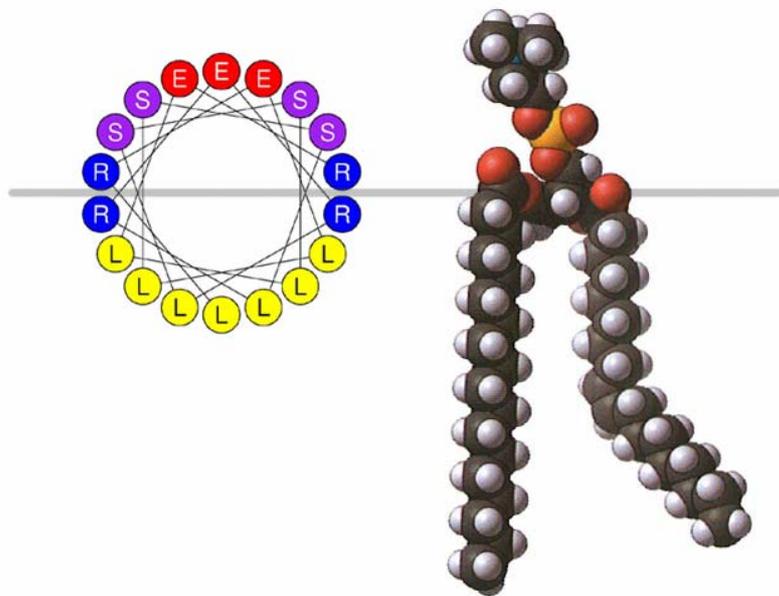


Figure 69 : Les hélices amphipathiques sont adaptées à un environnement particulier, ni hydrophobe, ni aqueux. L'axe de l'hélice se positionne généralement au niveau du glycérol des lipides. L'hélice 'type' dessinée ici comporte des résidus acides en 'crête' et des résidus basiques au niveau des 'ailes', lui permettant d'interagir de manière optimale avec la tête polaire zwitterionique des lipides comme le PC (ici représenté) ou le PE.

déformations membranaires différentes. Par exemple, la morphologie membranaire spéciale au niveau du cou d'un bourgeon vésiculaire, où se côtoient courbure positive et courbure négative, conviendrait à un domaine BAR, mais empêcherait la liaison d'un motif ALPS.

b) Aspects physico-chimiques des hélices amphipathiques et du motif ALPS

1. Propriétés des hélices amphipathiques et particularités du motif ALPS

Nos deux études révèlent qu'ArfGAP1 se lie aux membranes lipidiques grâce à des motifs présents en dehors de la partie catalytique d'ArfGAP1, non structurés en solution, se replient en hélices α amphipathiques d'un type nouveau, uniquement au contact de membranes fortement courbées. Ces hélices amphipathiques ALPS se démarquent des hélices α amphipathiques 'classiques' par leur chimie plutôt atypique.

Les hélices amphipathiques sont des structures secondaires communes, souvent utilisées comme moyen d'ancrage membranaire réversible par des protéines périphériques (Cornell and Taneva, 2006). L'hélice est structurée lorsqu'elle est liée à la membrane, mais se déplie et perd sa structure en solution. Parfaitement adaptées à l'interface cytosol/membrane, les hélices amphipathiques se replient et se positionnent au niveau du glycérol des lipides, où règne un environnement particulier, ni aqueux, ni hydrophobe (Hristova et al., 1999). Cette caractéristique vient de la disposition particulière de leurs acides aminés, où les résidus polaires et hydrophobes pointent dans des directions opposées, formant les faces polaire et apolaire de l'hélice. On comprendra que le repliement en hélice, qui sépare de façon optimale ces différents types de résidus, est thermodynamiquement plus favorable que toute autre structure dans la membrane. S'il n'y a pas de séquence 'consensus' au sens strict du terme pour une hélice amphipathique, la séquence primaire de ces structures se caractérise typiquement par une répétition d'acides aminés hydrophobes tous les 3 ou 4 résidus (ce qui correspond à un tour d'hélice), entre lesquels s'intercalent des acides aminés polaires. Certains résidus, comme la proline, sont souvent absents des hélices amphipathiques, car elles créent des coudes et donc perturbent le repliement en hélice. De nombreux résidus chargés se situent généralement dans la face polaire des hélices amphipathiques ; ils permettant qu'une force électrostatique, qui implique les têtes polaires des lipides, puisse épauler la force de liaison des résidus hydrophobes de l'hélice entre les chaînes grasses des lipides, lors de son adsorption membranaire. Les résidus chargés sont souvent répartis d'une façon bien définie sur la face polaire d'une hélice: Les résidus anioniques sont localisés sur la 'crête' de

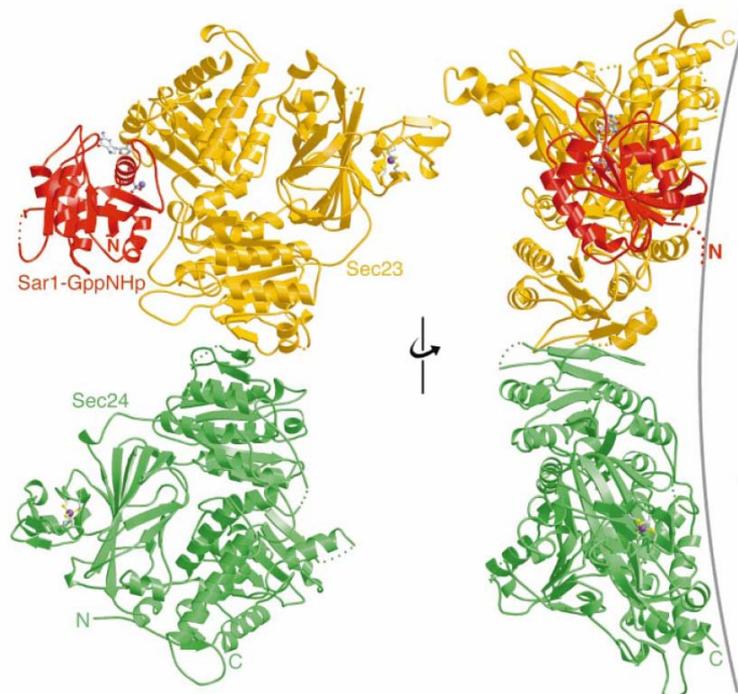


Figure 70 : Structure courbée de l'hétérodimère Sec23/Sec24 en complexe avec Sar1-GppNHp (Bi et al., 2002). (Le GppNHp est un analogue non hydrolysable du GTP). La ligne grise indique la courbure d'une vésicule de 60 nm de diamètre.

l'hélice, alors que les résidus basiques forment les 'ailes' de l'hélice (figure 69). Cette disposition permet aux résidus chargés de l'hélice de faire des interactions électrostatiques optimales avec les têtes polaires zwitterioniques de lipides tels que le PC ou le PE.

Il n'y a pas de spécificité très stricte à l'égard des lipides pour la liaison membranaire des hélices amphipathiques. Les forces hydrophobe et électrostatique qui gouvernent l'adsorption de l'hélice, agissent conjointement pour 'écarter' les lipides afin qu'elle puisse s'insérer profondément dans la membrane. Toutefois, le coût énergétique de ce phénomène étant important, les protéines ont souvent recours à un autre dispositif d'ancrage membranaire pour aider l'insertion de leur hélice. L'exemple de la petite protéine G Arf1, où un groupe myristate coopère avec l'hélice amphipathique N-terminale pour s'attacher à la membrane, illustre bien cela (Antonny et al., 1997a; Pasqualato et al., 2002). Cette aide réciproque est également retrouvée chez les protéines portant un domaine BAR muni d'une hélice amphipathique N-terminale (ou N-BAR), comme nous l'avons vu précédemment.

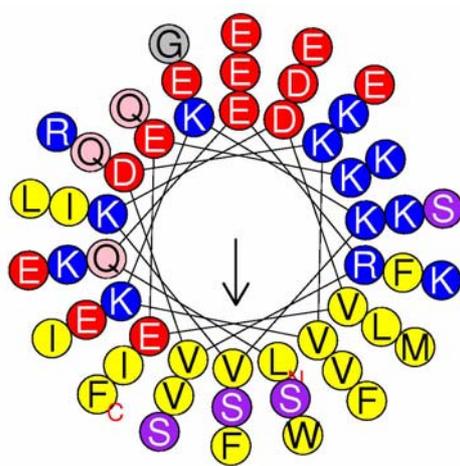
L'insertion d'une hélice amphipathique produit des tensions latérales dans un feuillet membranaire et un déséquilibre surfacique. Cette frustration engendre la courbure de la membrane, qui est plus favorable énergétiquement (figure 67). Ce type de mécanisme, inducteur de courbure membranaire par insertion hydrophobe, est également utilisé par d'autres protéines ne portant pas de domaines BAR, mais dont l'activité touche les phénomènes de déformations membranaires. Par exemple la petite protéine G Sar1, responsable de l'assemblage du manteau protéique COPII, semble initier la courbure membranaire du bourgeon par l'insertion de son hélice α amphipathique N-terminale (Lee et al., 2005a). Dans ce contexte, l'association de Sar1 avec le complexe Sec23/Sec24, dont la structure est très courbée, favoriserait d'autant plus cette déformation membranaire (figure 70). Un autre exemple intéressant est celui de l'Epsine, une protéine impliquée dans les processus d'endocytose dépendante de la clathrine, qui par son domaine ENTH se lie spécifiquement au lipide PI_(4,5)P2 d'une part, et génère la courbure membranaire d'autre part, grâce à une hélice amphipathique également impliquée dans cette reconnaissance spécifique (Ford et al., 2002). De ce fait, d'une manière générale, toutes les hélices amphipathiques 'classiques' de protéines périphériques sont, par nature, des inducteurs de courbure membranaire.

Quelle est la contribution de la force électrostatique par rapport à la force hydrophobe, pour l'adsorption d'une hélice amphipathique ? De nombreuses études indiquent que la force de liaison d'une hélice dépend de la charge nette à la surface de la membrane. En effet, la

liaison d'une hélice augmente lorsque le contenu en lipides anioniques des membranes augmente, ou lorsque la force ionique du tampon diminue (Bernstein et al., 2000; Davidson et al., 1998; Johnson et al., 1998). Ceci n'est pas étonnant, sachant que d'ordinaire, la charge nette d'une hélice amphipathique est positive. D'autre part, des mutations qui visent à réduire cette charge, en touchant les résidus basiques d'une hélice, montrent que la force de liaison de l'hélice diminue fortement. L'influence de la force électrostatique sur l'adsorption d'une hélice amphipathique paraît donc élevée, en particulier lorsque la membrane est riche en lipides anioniques.

Les mutations touchant les acides aminés hydrophobes des hélices amphipathiques ont un effet dramatique sur leur liaison membranaire. En effet, lorsque certains résidus hydrophobes sont remplacés par des résidus polaires, l'adsorption membranaire et le repliement des hélices sont sévèrement affectés, voire abolis (Bernstein et al., 2000; Lee et al., 2005a). Ceci indique que si l'attraction électrostatique contribue à la liaison membranaire, le caractère hydrophobe d'une hélice doit être considéré comme ce qui détermine en premier lieu la force de cette liaison.

Notre découverte des hélices de type ALPS dans la protéine ArfGAP1, a révélé un cas particulier d'hélice amphipathique. Contrairement aux autres hélices dont la face polaire porte généralement de nombreux résidus chargés, la face polaire de l'hélice ALPS est presque exclusivement composée de résidus sérine et thréonine. Ces résidus ne peuvent contribuer à l'insertion de l'hélice dans la membrane en interagissant de façon électrostatique avec les têtes polaires des lipides comme le font les résidus chargés. Ainsi, fait exceptionnel pour une hélice amphipathique, les charges de la membrane n'ont aucune influence sur l'adsorption d'un motif APLS, car seul le pouvoir hydrophobe est ici en jeu (figure 4 de l'article 1) (Bigay et al., 2005). Favoriser l'insertion purement hydrophobe d'une hélice de ce type dans la membrane, revient à rendre l'accès aux chaînes grasses des lipides plus facile à ses résidus hydrophobes. Ce processus est applicable dans diverses situations : Premièrement, lorsque la compaction des têtes polaires lipidiques diminue, c'est-à-dire lorsqu'elles sont 'écartées' les unes des autres ; par exemple dans un contexte de courbure membranaire positive, ou lorsque la membrane est riche en lipides à chaînes grasses monoinsaturées (de type DO) (figure 50) (Bigay et al., 2003). Deuxièmement, lorsque la membrane est riche en lipides ayant de petites têtes polaires, ou n'en ayant pas du tout (comme les DAG) (Antonny et al., 1997b). Bien sûr, la combinaison de ces deux situations ne peut qu'améliorer l'insertion de l'hélice ALPS dans la membrane, le but étant de minimiser la 'barrière' que constituent les têtes polaires des



CCT [242-293]

Figure 71 : L'hélice amphipathique de la protéine CCT, constituée de 51 résidus consécutifs (Cornell et al., 2006).

lipides. En revanche, les motifs ALPS ne peuvent pratiquement pas se lier et se replier en hélice sur une membrane plane, où la compaction entre les têtes polaires des lipides est importante. Ainsi, ces motifs sont des senseurs de la compaction lipidique membranaire, et donc, par extension, de courbure membranaire. Il découle de cela une question qui me paraît intéressante : Est-ce que toute hélice amphipathique peut sentir la courbure membranaire ?

2. Les hélices amphipathiques préfèrent-elles la courbure membranaire ?

La réponse est certainement « oui » sur une membrane neutre. En effet, dans ce cas, une hélice amphipathique chargée ou non, n'a pour solution que la force hydrophobe pour interagir avec la membrane ; ainsi les défauts de compaction des têtes polaires sont avantageux pour son insertion membranaire. En fait, nous nous retrouvons dans le cas d'une hélice de type ALPS sur une membrane classique : la pauvreté en résidus chargés du motif ALPS, le rend 'aveugle' vis-à-vis des charges portées par les lipides, ce qui l'oblige à n'utiliser que la force hydrophobe pour pénétrer dans la membrane.

La réponse est plus subtile lorsqu'il s'agit d'une membrane classique, contenant une certaine proportion de lipides chargés. Encore une fois, la courbure membranaire pourrait effectivement 'soulager' le coût énergétique que doit fournir l'hélice pour écarter les lipides afin de s'insérer dans la membrane, ce qui faciliterait de ce fait l'adsorption de l'hélice. Des travaux portant la protéine CCT (CTP: phosphocholine cytidyltransferase), possédant une hélice amphipathique dont la face polaire est très riche en résidus chargés et pauvres en sérine et thréonine, indiquent que son activité est plus importante en présence de petits liposomes qu'en présence de MLVs (figure 71) (Cornell, 1991). De façon intéressante, cette protéine répond aussi au DAG, comme ArfGAP1. Un autre exemple est celui de l' α -synucléine. Cette protéine, dont je reparlerai, porte deux hélices amphipathiques très chargées également, et se lie aux membranes avec une forte dépendance à la courbure (Davidson et al., 1998; Nuscher et al., 2004). Il faut toutefois noter que les hélices de la CCT et de l' α -synucléine ont une charge nette proche de zéro, ce qui est assez inhabituel pour des hélices amphipathiques. En règle générale, elles ont en effet une charge nette largement positive. Or l'hélice de la CCT porte autant de résidus anioniques que de résidus cationiques (13 de chaque !) dans sa face polaire. Puisque la charge nette d'une hélice amphipathique dicte souvent la force de sa liaison membranaire, il n'est pas impossible que les hélices de la CCT et de l' α -synucléine puissent profiter du fait que leurs charges soient en quelque sorte 'masquées', pour ainsi interagir essentiellement de façon hydrophobe avec la membrane, et donc sentir la courbure

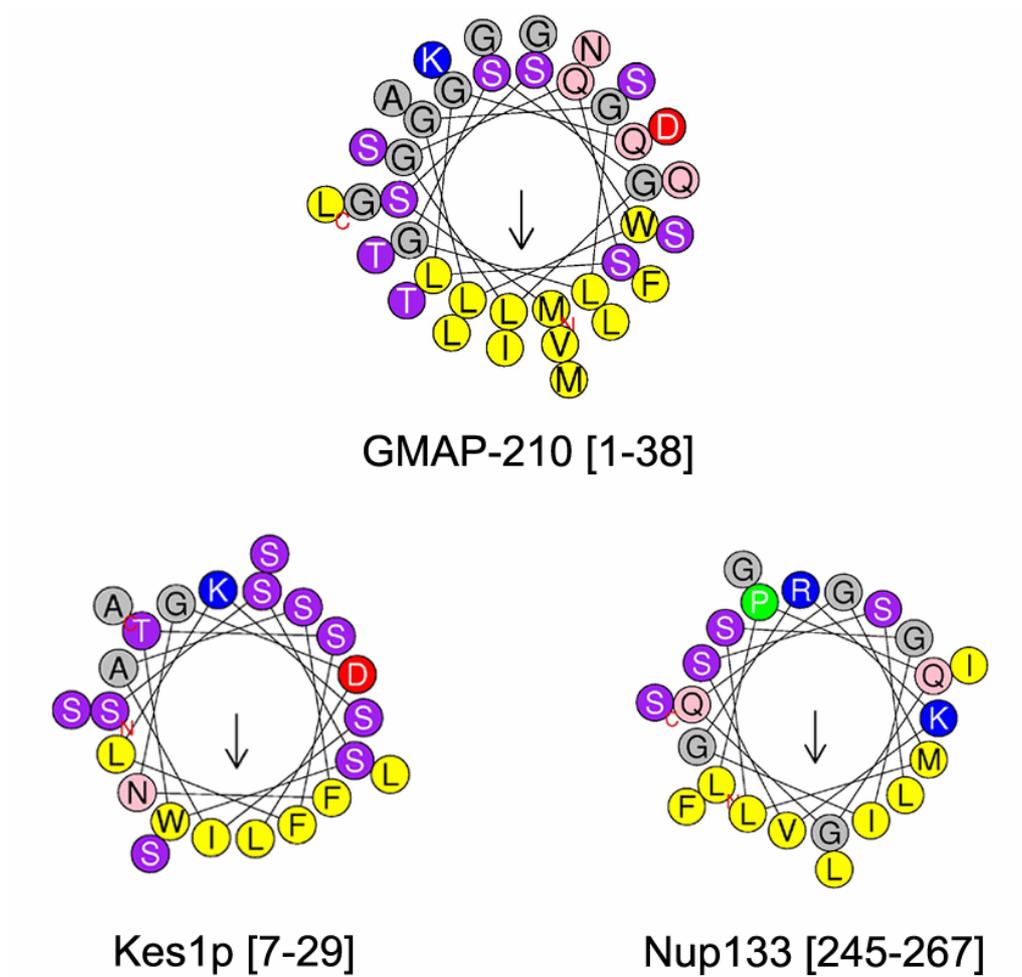


Figure 72 : Des motifs de type ALPS présents dans d'autres protéines. Ces motifs leur permettent de sentir la courbure membranaire (Drin et al., 2007).

membranaire. Pourtant, un mélange de charges dans la face polaire des hélices est souvent bien adapté pour les interactions avec les têtes polaires zwitterioniques des lipides. Ce qui rend ces protéines sensibles à la courbure membranaire n'est donc pas très clair.

Des travaux récents réalisés dans notre laboratoire, visant à rendre le motif ALPS d'ArfGAP1 moins dépendant de l'effet hydrophobe, ont montré que l'introduction d'une composante électrostatique dans l'hélice réduit l'influence de la courbure membranaire sur sa liaison (Drin et al., 2007). En effet, l'incorporation de lysines, précisément à l'interface polaire/apolaire de l'hélice ALPS, c'est-à-dire au niveau de ses 'ailes', augmente considérablement sa liaison sur des gros liposomes ($R_h=125$ nm) de type Golgi-mix. Bien qu'une légère sensibilité à la courbure soit encore observée, elle est fortement atténuée par rapport à celle du motif ALPS 'sauvage'. Ces expériences mettent ainsi en évidence le caractère inadapté de la force électrostatique dans les hélices amphipathiques qui ont la 'vocation' de sentir la courbure membranaire.

La découverte par bioinformatique d'hélices amphipathiques de type ALPS dans de nombreuses protéines, a permis de montrer que l'usage de cette hélice est un procédé général pour sentir les défauts de compaction lipidiques dans les membranes (figure 72) (Drin et al., 2007). Ce mécanisme astucieux n'est donc pas l'apanage d'ArfGAP1 et de son homologue chez la levure Gcs1p, puisque des dizaines de protéines chez l'homme, comme chez la levure pourraient avoir recours à ces hélices amphipathiques ALPS. De manière importante, les protéines impliquées couvrent un large éventail de fonctions à travers la cellule, et ne sont pas forcément limitées au Golgi. Prenons l'exemple de Nup133 qui possède un motif ALPS. Cette nucléoporine fait partie du complexe protéique formant le pore nucléaire, véritable porte d'entrée dans le noyau à travers l'enveloppe nucléaire. Si peu de choses sont connues à propos des interactions entre les protéines et la membrane nucléaire, l'enveloppe nucléaire est soumise à une forte courbure au niveau des pores nucléaires, qui pourrait être adaptée à la liaison d'un motif ALPS. D'autre part, la membrane nucléaire se fragmente lors de la mitose en de multiples petites vésicules, avant qu'elles ne se rassemblent par fusion. La protéine Nup133, impliquée dans les événements précoces de réassemblage du pore nucléaire, pourrait très tôt reconnaître ces petites vésicules par son motif ALPS (Walther et al., 2003). Cet exemple, parmi bien d'autres, où la fonction d'une protéine semble liée à la courbure membranaire (ou plus généralement au défaut de compaction des lipides de la membrane), justifierait la présence d'un motif ALPS.

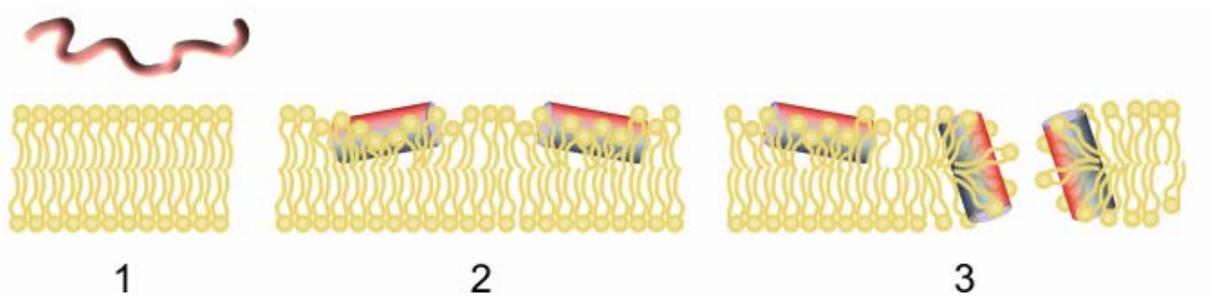


Figure 73 : Formation de pores toroïdaux par les peptides antimicrobiens. Non repliés en solution (1), ils se structurent en s'adsorbant sur la membrane (2). Ces peptides déstabilisent le feuillet externe de la membrane et coopèrent pour former des pores toroïdaux de ~ 40 Å de rayon (3).

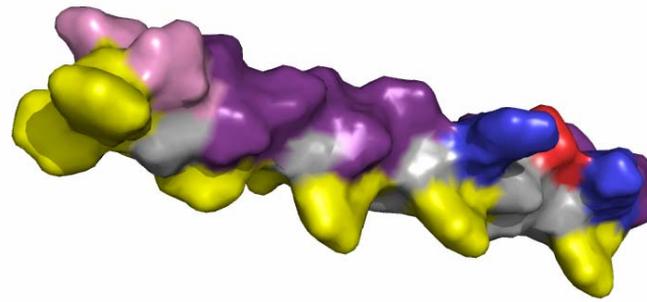
3. Physico-chimie structurale des hélices amphipathiques et des motifs ALPS

La liaison des hélices amphipathiques des protéines périphériques à la surface des membranes est généralement considérée comme faible, car les constantes de dissociation relatives sont de l'ordre du micromolaire voire du millimolaire. Cependant, cette notion reste vague car elle fait intervenir de nombreux éléments, comme la physico-chimie de l'hélice mais aussi celle de la membrane. Malgré tout, plusieurs paramètres moléculaires sont mesurables sur une hélice amphipathique, permettant d'estimer la force, mais aussi la spécificité de sa liaison. L'hélicité, l'hydrophobicité, le moment hydrophobe, la charge et enfin la 'part' relative de chacune des faces polaire/apolaire de l'hélice sont des paramètres intéressants à étudier. En fait, la combinaison de ces différents paramètres structuraux module la force et la spécificité de liaison d'une hélice amphipathique. Considérons d'abord l'hélicité : Nous avons vu que certains acides aminés favorisent la formation de structure en hélice, alors que d'autres, comme la proline ou la cystéine la déstabilisent. Le résidu glycine est aussi connu pour déstabiliser les hélices, car il augmente sa flexibilité. De nombreuses études mentionnent que la substitution de résidus glycine en leucine ou en alanine dans un peptide, augmente son aptitude à former une hélice, et inversement, la diminution de l'hélicité d'un peptide survient lorsqu'une lysine est remplacée par une glycine (Dathe and Wieprecht, 1999). Ces études ont surtout été réalisées sur des peptides antimicrobiens. Ces petits peptides très chargés, non repliés en solution, se structurent en hélice amphipathique au contact des membranes. Elles ont la propriété particulière de déstabiliser et de perméabiliser les membranes des bactéries, il en résulte une lyse cellulaire. Ceci vient du fait qu'au-delà d'une certaine concentration, les peptides antimicrobiens coopèrent pour induire des pores toroïdaux dans la membrane dont le rayon fait en moyenne $\sim 40 \text{ \AA}$ (figure 73) (Huang, 2006). L'hélicité de ces peptides, garantie par le petit nombre de glycines qu'ils portent, est déterminant pour leur activité antimicrobienne. D'une manière générale, les résidus glycines sont en très faible proportion ($n = 1$ ou 2) dans les hélices amphipathiques. Toutefois, l'hélice ALPS fait encore exception à la règle, avec un nombre de glycines généralement élevé. L'exemple du motif ALPS de GMAP-210 est frappant, avec 9 glycines sur 38 résidus (Drin et al., 2007). Cette flexibilité structurale pourrait permettre à ces hélices de changer de conformation plus rapidement, en passant d'un état replié à un état non replié. La flexibilité des ALPS pourrait aussi être un moyen pour prévenir d'avantage l'adsorption de ces hélices sur des membranes planes.

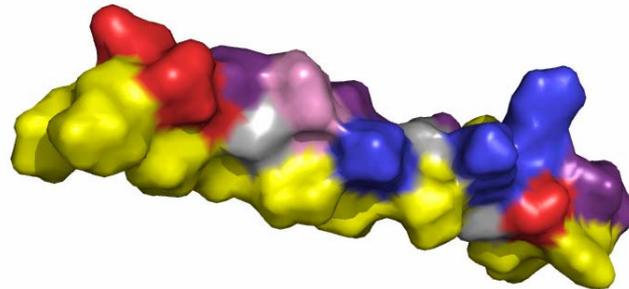
La force de liaison d'une hélice amphipathique dépend aussi de son hydrophobicité et de son moment hydrophobe. L'hydrophobicité moyenne d'une hélice (la valeur moyenne de l'hydrophobicité de tous les résidus de l'hélice), reflète sa faculté à passer d'un milieu aqueux à un milieu hydrophobe. Le moment hydrophobe est en revanche une mesure quantitative de l'amphipathicité d'une hélice. Il représente la somme des vecteurs individuels d'hydrophobicité des résidus qui composent l'hélice ; il donne ainsi la direction du 'gradient' d'hydrophobicité de l'hélice et attribue une valeur à la ségrégation des résidus non polaires par rapport aux résidus polaires. Les résidus chargés qui contribuent par leur force électrostatique à la liaison membranaire d'une hélice amphipathique sont très polaires, et par conséquent donnent du poids au moment hydrophobe d'une hélice. La composante électrostatique étant pratiquement absente dans les hélices ALPS, nous pourrions déterminer leur force de liaison relative simplement en se référant à leur hydrophobicité moyenne et au moment hydrophobe. Déterminer la force de liaison d'une hélice amphipathique 'classique' est moins évident du fait de la présence de résidus chargés dans leur face polaire. Les paramètres discutés ci-dessus peuvent même être biaisés lorsque les 'ailes' de l'hélice sont occupées par les résidus basiques lysine et arginine. En effet, selon le modèle du 'tuba' (*snorkel model*), ces résidus peuvent augmenter significativement l'affinité d'une hélice pour une membrane du fait de leur nature très amphipathique (Segrest et al., 1990). Le modèle propose que la longue chaîne latérale carbonée de ces résidus s'associe de manière hydrophobe avec les lipides, tout en s'étendant en direction de la face polaire de l'hélice, pour insérer son groupement chargé dans le milieu aqueux. Ce modèle prédit que la position interfaciale des résidus lysine et arginine ne va pas à l'encontre d'une pénétration profonde de l'hélice dans la membrane, mais au contraire la favorise par rapport à des hélices ayant des 'ailes' zwitterioniques ou non chargées. Ceci m'amène à considérer l'effet de la 'part' ou de l'angle de la face polaire par rapport à celle de la face apolaire dans la force de liaison d'une hélice. L'angle de la face polaire est un paramètre qui a souvent été étudié sur la liaison membranaire et l'activité perméabilisante des peptides antimicrobiens. L'effet le plus spectaculaire a été enregistré avec le peptide Magainin 2 (Wieprecht et al., 1997). Les auteurs montrent qu'un angle de face polaire large favorise la liaison des hélices sur des membranes riches en lipides anioniques mais réduit leur action perméabilisante, probablement par répulsion électrostatique entre les hélices, mais également du fait qu'une large composante hydrophobe est requise pour perturber efficacement la membrane. En effet, d'une manière générale, on s'attend à ce que cet angle influence la profondeur de pénétration d'une hélice amphipathique dans la membrane, tout en ne négligeant pas l'effet 'tuba' décrit ci-dessus.

De nombreuses protéines dans la cellule utilisent des hélices amphipathiques pour se lier de manière réversible aux membranes. Cependant, la composition lipidique de ces membranes varie fortement entre les différentes organelles. Par conséquent, l'interaction d'une hélice amphipathique avec une membrane donnée demande une certaine adaptabilité physico-chimique (Antonny, 2006). Les paramètres structuraux des hélices amphipathiques décrits précédemment, tels que l'hydrophobicité, la charge et l'angle de la face polaire, influent sur leur spécificité membranaire. Les membranes 'post golgiennes' comme celle des endosomes ou la membrane plasmique sont riches en cholestérol et en lipides ayant des acides gras saturés, mais aussi en lipides anioniques tels que la phosphatidylsérine. De ce fait, seules des hélices amphipathiques fortement chargées, comme celle de l'endophiline, peuvent s'y adsorber. En revanche, les compartiments 'pré golgiens', comme le Golgi ou le RE, ont une membrane dont l'organisation lipidique est moins compacte, car riches en acides gras insaturés et pauvres en cholestérol et en sphingomyéline. Ici s'adaptent parfaitement les hélices faiblement chargées, privilégiant les interactions hydrophobes avant tout. L'hélice amphipathique de Sar1 est un exemple typiquement intéressant, puisqu'elle possède une face hydrophobe imposante ($\sim 160^\circ$) et peu de résidus chargés dans sa face polaire. La face polaire des hélices amphipathiques de type ALPS est généralement plus grande mais dépourvue de charge. Cette physico-chimie semble également bien adaptée à la composition des membranes golgiennes, à condition qu'elles soient courbées.

En résumé, les propriétés structurales des hélices amphipathiques déterminent leur comportement vis-à-vis de la membrane. Leur adsorption membranaire est entraînée conjointement par les forces hydrophobe et électrostatique, qui agissent dans des proportions variables selon l'hélice considérée, et la force globale de leur liaison comme leur spécificité peuvent être estimées par divers moyens. A l'exception des ALPS, les hélices amphipathiques de protéines périphériques ont généralement assez de force pour écarter les têtes polaires des lipides de la membrane afin s'insérer profondément. En revanche, les hélices de type ALPS, ayant une grande face polaire très faiblement chargée, n'ont pas ce pouvoir. Ces hélices n'utilisent pratiquement que la force hydrophobe pour s'insérer dans les membranes, c'est pourquoi elles reconnaissent les défauts de compactations lipidiques, induits par exemple par la courbure membranaire. Le cas d'ArfGAP1 est particulièrement intéressant car c'est la seule protéine qui possède deux motifs ALPS. Regardons maintenant pourquoi cette protéine, avec ses deux motifs, est particulièrement bien adaptée au contexte membranaire des vésicules golgiennes COPI.

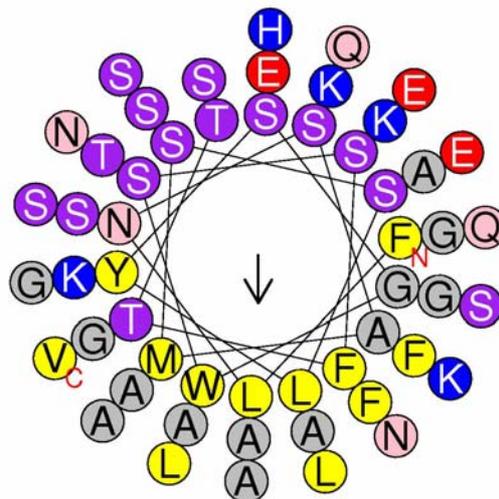


ALPS 1



ALPS 2

Figure 74 : Modélisation des hélices ALPS d'ArfGAP1. La nature des faces hydrophobes des deux hélices diverge : ALPS1 possède de gros résidus espacés de type phénylalanine, alors que la face hydrophobe d'ALPS2 n'est pratiquement composée que de petits résidus de type valine.



ALPS 1 199-251

Figure 75 : Motif ALPS1 'étendu'. L'amphipathicité de l'hélice est conservée jusqu'au résidu 251, mais non au-delà.

c) La liaison membranaire d'ArfGAP1, adaptation et régulation

1. Comparaison ALPS1/ALPS2

Dès les premières expériences sur les motifs ALPS1 et ALPS2 de la protéine ArfGAP1, nous avons remarqué qu'ils se comportaient différemment sur une membrane. Effectivement, ALPS1 s'adsorbe et se replie en hélice plus facilement qu'ALPS2 sur des petits liposomes (figure 2 de l'article II). La comparaison de l'hydrophobicité moyenne et du moment hydrophobe des hélices ALPS1 et 2 sur des fenêtres de 18 résidus le confirme : Si les moments hydrophobes des deux ALPS se ressemblent et varient peu le long des hélices, l'hydrophobicité moyenne d'ALPS1 est, en revanche, largement supérieure à celle d'ALPS2, et ce, surtout si l'on considère la première moitié de l'hélice ALPS1. La distinction frappante entre ALPS1 et ALPS2 est la nature de leur face hydrophobe. La modélisation en hélice α des structures des motifs ALPS1 et ALPS2 donne le sentiment que la puissance hydrophobe d'ALPS1 provient en fait de l'espacement des gros résidus hydrophobes (phénylalanines) le long de l'axe de l'hélice, permettant ainsi d'optimiser leur surface d'interaction avec les lipides, et ainsi de pénétrer profondément dans la membrane (figure 74). La face hydrophobe d'ALPS2 est en revanche composée de nombreux petits résidus (valines essentiellement), et semble moins compétente pour créer des interactions aussi fortes. D'autre part, l'hélice ALPS1 est plus longue qu'ALPS2, ce qui pourrait accroître son efficacité de liaison.

A ce sujet, les limites que nous avons définies pour ALPS1 et ALPS2 sont bien sûr discutables. Nous supposons qu'ALPS1 s'étend entre les résidus 199 et 234, et ALPS2 entre les résidus 264 et 295, mais il est difficile de donner une limite réelle à une hélice amphipathique dans sa forme membranaire, tant que l'on ne dispose pas de sa structure RMN. La plus forte incertitude concerne le C-terminal du motif ALPS1, car la séquence entre les résidus 234 et 251 semble garder des propriétés amphipathiques, même si elle perd un peu de son caractère hydrophobe (figure 75). D'autre part, nos expériences de flottaison indiquent que le fragment 192-257 se lie mieux sur des liposomes que le fragment 192-231 (Bigay et al., 2005). L'amphipathicité est clairement perdue à partir du résidu 252, et ce jusqu'au résidu 263. De plus, la présence d'un résidu proline en position 254, et le fait que la région qui l'entoure ne soit pas 'en phase' avec les hélices amphipathiques ALPS1 et ALPS2, confortent notre hypothèse selon laquelle la protéine ArfGAP1 porte bien deux motifs ALPS séparés, et non un long et unique motif ALPS. Par ailleurs, un grand motif ALPS linéaire ne serait pas

compatible avec la taille d'une vésicule COPI ; un coude fourni par la proline entre les deux motifs ALPS pourrait de ce fait permettre à la protéine ArfGAP1 de s'adapter convenablement à la forte courbure d'une vésicule COPI.

2. Pourquoi un deuxième ALPS ?

Nos expériences révèlent qu'une synergie s'opère entre les deux hélices amphipathiques ALPS1 et ALPS2 pour accroître leur adsorption membranaire. De ce fait, le couple ALPS1-ALPS2 possède une force de liaison beaucoup plus élevée que celle des deux motifs indépendants. Ceci est confirmé par le fort repliement en hélice α du peptide ALPS1-ALPS2 au contact de liposomes soniqués, avec une proportion de résidus en hélice estimée à 80%, soit 90 acides aminés, ce qui est bien supérieur à la somme des longueurs d'hélices estimées initialement pour les motifs ALPS1 et ALPS2 lorsqu'ils sont séparés (somme : 68 résidus). Cette synergie explique que la présence de deux motifs ALPS sur ArfGAP1, au lieu d'un seul, module sa réponse à la courbure membranaire (Mesmin et al., 2007). En effet, la liaison et l'activité d'ArfGAP1 sans motif ALPS2 demandent un degré de courbure membranaire plus élevé pour avoir une réponse d'intensité identique à celle observée avec la protéine sauvage. Ce décalage de courbure dans nos expériences est de 20 à 30 nm dans le rayon des liposomes utilisés (figure 6 de l'article II). La question est donc de savoir si ALPS2 est un réel atout pour ArfGAP1 dans le contexte golgien des vésicules COPI.

Le bourgeonnement d'une vésicule à partir de la membrane plane d'une citerne golgienne est un processus dynamique, sans doute comparable au bourgeonnement d'une vésicule à clathrine qui se produit en une vingtaine de secondes (Ehrlich et al., 2004). Il comprend la mise en place de la machinerie protéique sur la membrane, la déformation membranaire induite par la polymérisation du manteau COPI, et enfin le mécanisme de fission membranaire. Lors de l'étape de déformation membranaire, la courbure du bourgeon naissant évolue rapidement, pour atteindre une courbure membranaire maximale au moment de la fission (équivalente à celle d'un liposome de 30 nm de rayon). Notre interprétation 'clé' est la suivante : Tout ce passe comme si la réponse d'ArfGAP1 était réglée selon un compromis visant à ce qu'elle ne soit pas trop intense sur un bourgeon encore trop jeune et ainsi compromettre la polymérisation du manteau, mais suffisamment efficace, passé un certain seuil de courbure, pour permettre le recyclage rapide des protéines Arf1 sans porter préjudice à la polymérisation du manteau. Le manteau resterait attaché à la membrane par métastabilité jusqu'à la fission de la vésicule, et se désassemblerait ensuite pour être recyclé à

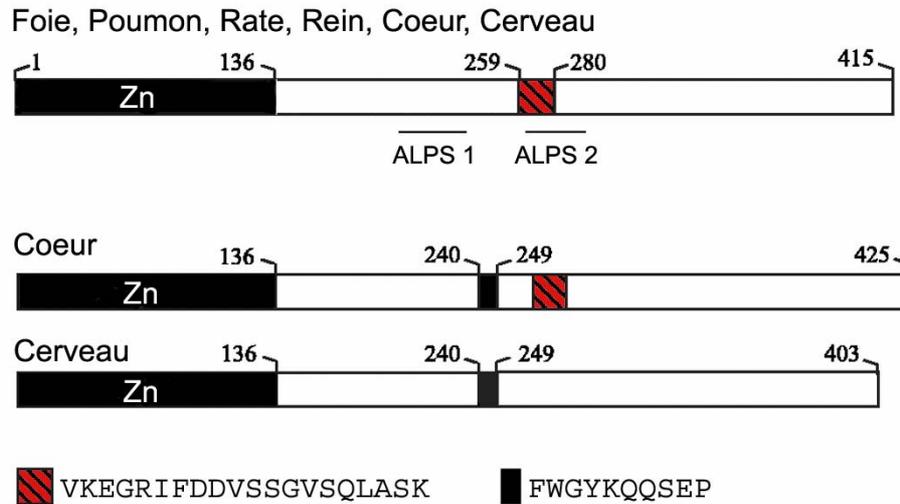


Figure 76 : Les isoformes tissu-spécifiques de la protéine ArfGAP1 (Parnis et al., 2006). L'isoforme spécifique du cœur possède une insertion de 10 résidus en aval du motif ALPS1. L'isoforme du cerveau possède également cette insertion, mais présente en plus une délétion de 20 résidus, dont 15 qui appartiennent au motif ALPS2.

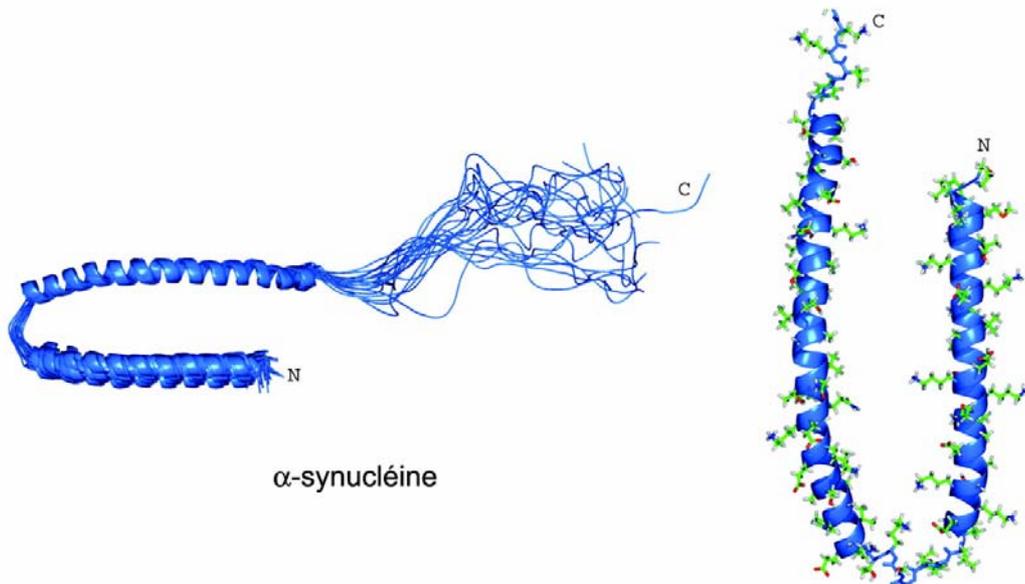


Figure 77 : Structure RMN de l' α -synucléine repliée en hélice sur des micelles de SDS (Ulmer et al., 2005).

son tour. Ainsi, ArfGAP1 s'adapterait de manière optimale à la courbure membranaire des bourgeons vésiculaires golgiens, pour y orchestrer le recyclage dynamique de la machinerie COPI.

De façon intéressante, Dan Cassel et son équipe ont montré récemment qu'il existait des isoformes de la protéine ArfGAP1, spécifiques de certains tissus (Parnis et al., 2006). Une isoforme de la protéine, enrichie dans le cœur, possède une insertion de 10 résidus après le résidu 239, soit juste après ALPS1 tel que nous l'avons défini dans l'article (figure 76). Cette insertion ne permet pas un prolongement de l'hélice amphipathique, mais vient au contraire certainement la 'casser'. La seconde isoforme est spécifique du cerveau. Cette protéine possède la même insertion que l'isoforme présente dans le cœur, mais possède en plus une délétion entre les résidus 259 et 280. Cette délétion englobe donc plus de la moitié du motif ALPS2. De ce fait, une protéine avec un seul ALPS fonctionnel est présente dans le cerveau. Nos expériences indiquent que la protéine ArfGAP1 sans ALPS2 répond différemment à la courbure de membranes 'golgiennes' (Golgi-mix) : La protéine demande un degré de courbure plus élevé pour fournir la même réponse que la protéine sauvage. En revanche, dans des conditions membranaires particulières, lorsque par exemple la membrane est riche en DO-lipides, la réponse à la courbure d'ArfGAP1 dépourvu d'ALPS2 ressemble à celle de la protéine sauvage sur membrane golgienne classique (figure 7 de l'article II). En effet, un taux d'insaturation plus élevé des chaînes grasses lipidiques augmente le désordre et l'espacement entre les têtes polaires, ce qui favorise l'insertion de l'hélice. La composition lipidique du cerveau est différente de celle des autres tissus, en particulier le taux d'insaturation lipidique y est, d'une manière générale, plus élevé. Notre hypothèse est que la protéine isoforme d'ArfGAP1 spécifique du cerveau serait mieux adaptée à la composition lipidique de cet organe.

3. Le parallèle entre ArfGAP1 et l' α -synucléine

D'autres protéines périphériques possèdent également deux hélices amphipathiques pour se lier aux membranes. L'exemple le plus connu est l' α -synucléine, une protéine présynaptique de 14 kDa, abondante dans le cerveau, dont le mauvais repliement est associée à la maladie de Parkinson. L' α -synucléine se localise sur la membrane de petites vésicules synaptiques proches de la membrane plasmique, mais sa fonction normale reste à préciser. Certains résultats suggèrent toutefois qu'elle joue un rôle dans le recyclage et le maintien de vésicules synaptiques de 'réserve' (Cabin et al., 2002). Comprendre les différences physico-

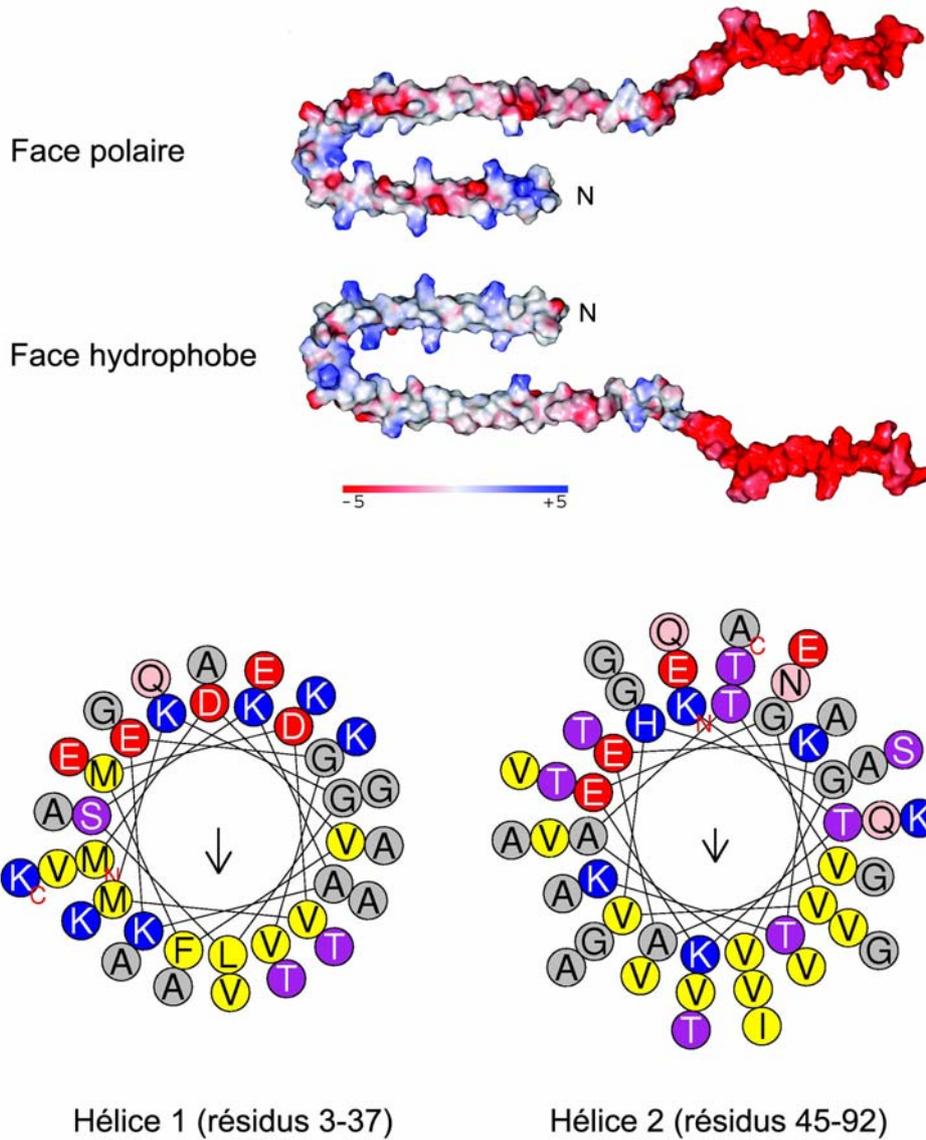


Figure 78 : Surface de la structure de l' α -synucléine repliée en hélice sur des micelles de SDS, colorée selon son potentiel électrostatique (Ulmer et al., 2005). Deux vues sont représentées, une de la face 'polaire' et l'autre de la face 'hydrophobe'. Notons la position interfaciale des lysines, qui forment les ailes des hélices. Les représentations en hélices révèlent que leurs faces hydrophobes sont très riches en valines.

chimiques entre les hélices amphipathiques de l' α -synucléine et d'ArfGAP1 est particulièrement intéressant puisque ces deux protéines se lient de manière préférentielle sur des vésicules de petits diamètres plutôt que sur des grandes vésicules. L' α -synucléine se replie effectivement en hélice α à la surface de petits liposomes (20-25 nm de diamètre) et non sur les MLVs (~125 nm de diamètre), à condition qu'ils contiennent des lipides à tête polaire anionique (Davidson et al., 1998). La structure de l' α -synucléine repliée en hélice sur des micelles de SDS a été obtenue par spectroscopie RMN récemment (figure 77) (Ulmer et al., 2005). Cette structure montre deux grandes hélices d'apparence un peu courbées, reliées entre elles par une séquence non repliée de quelques résidus seulement. La courbure des hélices s'ajusterait sur une vésicule de 15 nm de diamètre. Notons toutefois que cette valeur, très basse, est peut être biaisée par l'utilisation de micelles lors de la mesure RMN. Les deux hélices (acides aminés 1-37 et 45-92) possèdent une large face polaire fortement chargée, avec des résidus lysines en position interfaciale (figure 78). Cette protéine semble donc bien adaptée pour se lier à la membrane fortement chargée des petites vésicules synaptiques proches de la membrane plasmique. De manière surprenante, les faces apolaires des deux hélices sont extrêmement riches en résidus valines, le plus petit des résidus hydrophobes. Cet ornement de valines est également retrouvé dans la face hydrophobe de l'hélice ALPS2. Les chaînes latérales trop courtes des valines ne peuvent pénétrer profondément dans la membrane. Est-ce que cette caractéristique est compatible avec les propriétés physico-chimiques d'une membrane très courbée, dont la composition lipidique ressemble à celle de la membrane plasmique ? On pourrait penser que la forte compaction lipidique dans ces membranes n'est pas compatible avec l'insertion des gros résidus hydrophobes, alors que les valines seraient adaptées. D'autre part, il serait intéressant de connaître l'effet d'un taux élevé en cholestérol sur l'adsorption membranaire d'une hélice amphipathique, car ce lipide a tendance à modifier les propriétés physiques des membranes. Finalement, la courbure membranaire fournit peut-être l'aide supplémentaire que nécessitent les hélices de l' α -synucléine pour s'adsorber correctement sur les membranes, du fait de leurs 'faibles' faces hydrophobes. Notons que les hélices de l' α -synucléine portent comme les hélices ALPS beaucoup de résidus glycines. La présence de ces résidus dans l' α -synucléine diminuerait d'avantage sa disposition à se replier en hélice à la surface d'une membrane plane, pour restreindre la protéine à ne se lier qu'aux membranes courbées.

4. La phosphorylation, l'idée d'une régulation

L'idée que la face polaire d'une hélice ALPS ne lui permet pas d'interagir avec la région polaire de la membrane vient du fait qu'elle est exceptionnellement riche en sérines et en thréonines. De manière remarquable, la présence de ces deux résidus est privilégiée dans l'hélice ALPS au détriment de deux autres résidus également polaires et non chargés, l'asparagine et la glutamine. Les raisons de cette prévalence ne sont pas connues, toutefois les groupements amides des résidus asparagine et glutamine sont connus pour faire des ponts hydrogènes facilement, et pourraient générer une agrégation des motifs ALPS. En revanche, la présence de résidus sérine et thréonine, pas plus réactifs que l'eau, prévient cette éventualité. D'autre part, la présence de sérines et de thréonines dans une protéine lui donne la particularité d'être phosphorylable, ce qui rend sa régulation envisageable.

Cette possibilité a été étudiée sur la protéine ArfGAP1 (Yu and Roth, 2002). Les auteurs montrent qu'ArfGAP1 est phosphorylée de manière spécifique par la protéine Caséine Kinase I δ (CKI δ). Cette phosphorylation intervient dans la partie non catalytique d'ArfGAP1, mais les sites de phosphorylation n'ont pas été identifiés. Les auteurs indiquent que la localisation golgienne d'ArfGAP1 serait dépendante de sa phosphorylation. La protéine ArfGAP1 perd en effet cette localisation suite à l'action d'un inhibiteur de la CKI δ . Si cette étude a le mérite de révéler un autre aspect de la régulation d'ArfGAP1, de nombreuses questions restent en suspens. Comment agit la CKI δ ? Quelles propriétés d'ArfGAP1 sont touchées par l'action de la kinase ? Les différentes isoformes de la CKI reconnaissent une séquence consensus particulière sur leurs substrats : S/T(P)-X-X-S/T (qui peut également être D/E_(n)-X-X-S/T). Le site de phosphorylation (en gras) se localise 3 résidus en aval d'une sérine/thréonine déjà phosphorylée, ou d'un groupe de résidus chargés négativement (Knippschild et al., 2005). Ceci signifie qu'une protéine comme ArfGAP1, qui possède de nombreuses sérines et thréonines espacées de deux résidus, pourrait être 'multi-phosphorylée' de façon successive par la CKI δ (Roach, 1991). La phosphorylation multiple de la protéine ArfGAP1 pourrait éventuellement toucher la région des motifs ALPS, riche en sérines et thréonines, et ainsi avoir des conséquences sur la formation des hélices. En effet, l'encombrement stérique et les fortes charges négatives apportées par les phosphorylations pourraient empêcher le repliement et l'insertion des hélices dans la membrane. Pourtant, les travaux de Yu et Roth semblent indiquer qu'au contraire, la phosphorylation d'ArfGAP1 est nécessaire pour la localisation de la protéine au Golgi. Bref, le mécanisme moléculaire de ce phénomène reste à ce jour inexplicé. En tout état de cause, il semble que la CKI δ joue un rôle important dans le trafic vésiculaire car d'une part, elle est co-localisée avec la protéine β -COP dans la cellule, et

d'autre part son inhibition conduit au blocage de la voie de sécrétion entre le RE et le Golgi (Milne et al., 2001; Yu and Roth, 2002). De plus, les protéines homologues de la CKI chez la levure, Yck1p et Yck2p, nécessaires pour la viabilité des cellules, sont liées fonctionnellement à Gcs1p, l'homologue d'ArfGAP1. En effet, la copie multiple des gènes YCK1 et YCK2 (aussi appelés respectivement CKI2 et CKI1) dans la levure suppriment le défaut de croissance dû à la délétion du gène GCS1 (Wang et al., 1996). Selon une hypothèse, les kinases Yck1p et Yck2p agiraient 'de force' sur une protéine ayant un rôle parallèle à Gcs1p. Il se trouve que Gcs1p a une fonction redondante avec une autre protéine dans la levure, Glo3p (Poon et al., 1999). Glo3p pourrait donc être le candidat à la phosphorylation par les kinases Yck1p et Yck2p.

e) Conclusion

Ce travail de thèse a d'abord porté sur la régulation de la protéine ArfGAP1 par les membranes lipidiques. Il a permis d'identifier et de caractériser les deux motifs ALPS de la protéine ArfGAP1, qui la rendent hypersensible à la courbure membranaire. Les motifs ALPS sont non structurés en solution, mais se replient en hélices amphipathiques très particulières lors de leur liaison membranaire. Ces hélices profitent des défauts de compaction lipidique induits par la courbure, pour s'insérer dans la membrane. Ce travail a révélé que les deux motifs ALPS d'ArfGAP1 agissent de concert, pour ajuster de façon optimale la réponse de la protéine à la courbure membranaire d'un bourgeon vésiculaire COPI en formation.

Mon travail de thèse s'est finalement orienté sur ArfGAP3, une protéine encore peu étudiée, possédant une fonction redondante avec celle d'ArfGAP1. Cette protéine, homologue de la protéine Glo3p de levure, fait appel à des mécanismes moléculaires différents de ceux d'ArfGAP1 pour hydrolyser le GTP d'Arf1. Au lieu de se lier à la membrane de manière courbure dépendante comme ArfGAP1, ArfGAP3 interagit directement avec le coatomer. Nous émettons l'hypothèse que la protéine ArfGAP3 est sensible à un certain état de polymérisation du manteau, une propriété qui expliquerait la régulation spatio-temporelle de son activité.

Il reste maintenant à déterminer et caractériser la région d'ArfGAP3 qui se lie spécifiquement au coatomer. Cette région pourrait impliquer les séquences ISSxxxFG répétées, décrites comme nécessaires à la fonction de Glo3p. Les régions à caractère hydrophobe/amphiphile d'ArfGAP3 sont également à considérer. En effet, un mécanisme utilisé par certaines protéines non structurées en solution, consiste à se replier en structures ordonnées au contact de leur protéine cible. De façon intéressante, ces structures sont souvent des hélices amphipathiques (Dyson and Wright, 2002; Radhakrishnan et al., 1997).

Finalement, il faudra prouver que la séquence à l'extrémité C-terminale d'ArfGAP3 se replie bien en l'hélice amphipathique, et comprendre son implication dans la liaison de la protéine sur les vésicules COPI. Ces indications fourniront des éléments permettant de différencier davantage les outils moléculaires dont disposent ArfGAP3 et ArfGAP1 pour inactiver Arf1. Ces éléments permettront d'attribuer à ces ArfGAPs un rôle plus précis dans l'appareil de Golgi.

ANNEXES

ARTICLE ANNEXE 1 :

A phosphatidylserine-binding site in the cytosolic fragment of *Clostridium sordellii* Lethal Toxin facilitates glucosylation of membrane-bound Rac and is required for cytotoxicity

**Bruno Mesmin, Karine Robbe, Blandine Geny,
Frédéric Luton, Gérard Brandolin, Michel Popoff,
Bruno Antony**

A Phosphatidylserine-binding Site in the Cytosolic Fragment of *Clostridium sordellii* Lethal Toxin Facilitates Glucosylation of Membrane-bound Rac and Is Required for Cytotoxicity*

Received for publication, June 21, 2004, and in revised form, September 21, 2004
Published, JBC Papers in Press, September 21, 2004, DOI 10.1074/jbc.M406903200

Bruno Mesmin^{‡§}, Karine Robbe^{‡§¶}, Blandine Geny^{||}, Frédéric Luton^{‡**}, Gérard Brandolin^{‡‡}, Michel R. Popoff^{||§§}, and Bruno Antonny^{‡¶¶}

From the [‡]CNRS, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne, France, the ^{||}Institut Pasteur, Unité Bactéries Anaérobies et Toxines, 28 Rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France, and the ^{‡‡}Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, Unité Mixte de Recherche 5092, Commissariat à l'Énergie Atomique-CNRS, Université Joseph Fourier, 17 Avenue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France

Large clostridial toxins glucosylate some small G proteins on a threonine residue, thereby preventing their interactions with effector molecules and regulators. We show that the glucosyltransferase domain of lethal toxin from *Clostridium sordellii* (LT_{cyt}; amino acids 1–546), which is released into the cytosol during cell infection, binds preferentially to liposomes containing phosphatidylserine as compared with other anionic lipids. The binding of LT_{cyt} to phosphatidylserine increases by two orders of magnitude the rate of glucosylation of liposome-bound geranyl-geranylated Rac-GDP. Limited proteolysis and deletion studies show that the binding site for phosphatidylserine lies within the first 18 N-terminal residues of LT_{cyt}. Deletion of these residues abolishes the effect of phosphatidylserine on the activity of LT_{cyt} on liposome-bound geranyl-geranylated Rac-GDP and prevents the morphological effects induced by LT_{cyt} microinjection into various cells, but it does not affect the intrinsic activity of LT_{cyt} on non-geranyl-geranylated Rac-GDP in solution. We conclude that the avidity of LT_{cyt} for phosphatidylserine facilitates its targeting to the cytosolic leaflet of cell membranes and, notably, the plasma membrane, where this anionic lipid is abundant and where several targets of lethal toxin reside.

and alpha toxin from *Clostridium novyi* add a glucosyl group on various small G proteins (1–3). The targets of *C. difficile* toxins A and B are members of the Rho/Rac/Cdc42 family, a small G protein subfamily that plays a critical role in the control of cell morphology. The spectrum of LT partially overlaps that of *C. difficile* toxins. LT glucosylates Rac but also members of the Ras subfamily (Ras, Ral, and Rap) (2). In all cases the toxin acts as a glucosyltransferase, catalyzing the transfer of a glucosyl group from a nucleotide sugar (usually UDP-glucose) to a conserved threonine residue. This threonine (Thr-35 in Rac) participates in the coordination of the nucleotide, belongs to one of the two switch regions that undergo a conformational change upon GDP/GTP exchange and GTP hydrolysis, and is involved in effector binding. Threonine glucosylation prevents the interaction of the small G protein with effector molecules and interferes with the catalysis of GDP/GTP exchange and GTP hydrolysis by guanine nucleotide exchange factors and GTPase-activating proteins (4–6).

Large clostridial toxins are composed of three domains that act sequentially during cell infection (Fig. 1A) (7). The 500-amino acid C-terminal domain is involved in the specific recognition of cell surface receptors. After endocytosis, a central hydrophobic domain penetrates through the endosome membrane in a pH-dependent manner and drives the translocation of the N-terminal domain from the luminal side to the cytosolic side (8–10). The N-terminal domain (amino acids 1–546 in LT and toxin B), which is responsible for the glucosyltransferase activity, is then liberated by proteolytic cleavage in the cytosol and glucosylates intracellular targets (11, 12).

Most *in vitro* studies of the glucosyltransferase activity of large clostridial toxins have been carried out in solution using non-modified, recombinant small G proteins as substrates (1, 2, 4–6, 11). In cells, however, small G proteins are generally lipid-modified. The members of the Rho family are geranyl-geranylated at their C terminus and, as such, interact with lipid membranes. Alternatively, the members form a soluble 1:1 complex with GDI, a protein that masks the geranyl-geranylated group. RhoA in complex with GDI is not a substrate for glucosylation by toxin B from *C. difficile* (13). Indeed, GDI interacts not only with the lipid group but also with the switch regions of Rho proteins and thereby hinders threonine glucosylation (14–16). Considering the binary partitioning of Rho proteins between lipid membranes and GDI, it is therefore likely that only membrane-bound Rho proteins should be substrates for large clostridial toxins. This hypothesis was tested here using geranyl-geranylated Rac bound to liposomes of defined lipid composition. We show that because of a specific phos-

Numerous bacterial toxins affect the GDP/GTP cycle of G proteins. Large clostridial toxins, which include toxins A and B from *C. difficile*, lethal toxin (LT)¹ from *Clostridium sordellii*,

* This work was supported in part by grants from the Institut Pasteur (to M. R. P.) and the CNRS/Ministère de la Recherche (Actions Concertées Incitatives) (to B. A.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ These authors contributed equally to this work.

¶ Supported by la Ligue contre le Cancer.

** Supported by INSERM.

§§ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-1-4568-8307; Fax: 33-1-4061-3123; E-mail: mpopoff@pasteur.fr.

¶¶ Supported by the European Molecular Biology Organization Young Investigator Program and to whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-4-9395-7772; Fax: 33-4-9395-7710; E-mail: antonny@ipmc.cnrs.fr.

¹ The abbreviations used are: LT, *Clostridium sordellii* lethal toxin; LT_{cyt}, fragment 1–546 of LT; GDI, GDP dissociation inhibitor; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PS, phosphatidylserine; SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate.

phatidylserine-binding site located in the first 18 residues, the cytosolic fragment of lethal toxin glucosylates liposome-bound prenylated Rac-GDP very efficiently when the lipid bilayer displays a composition approaching that of the inner leaflet of the plasma membrane. Moreover, deletion of this N-terminal site abolishes the cytotoxic effects of LT observed *in vivo*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Lipids and Reagents—Liver phosphatidylethanolamine (PE), brain phosphatidylserine (PS), liver phosphatidylinositol (PI), brain phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), egg phosphatidylglycerol (PG), cholesterol, and synthetic lipids were from Avanti Polar Lipids. Egg phosphatidylcholine (PC) and phosphatidic acid (PA) were from Sigma. [¹⁴C]UDP-glucose was from Amersham Biosciences.

Protein Expression and Purification—Full-length LT was produced and purified from strain IP 82 as described (17). Fragments corresponding to amino acids 1–546 of LT_{cyt}, 19–546 of [Δ 18]LT_{cyt}, 1852–2366 of LT, and 1–546 of *C. difficile* toxin B were cloned in a pET28 vector (Merck-Novagen). This vector adds a hexahistidine tag and a thrombin cleavage site at the N terminus. The constructs were expressed in *Escherichia coli* and purified by nickel chromatography. In typical glucosylation and liposome binding experiments we observed that removal of the hexahistidine tag with thrombin did not modify the properties of LT_{cyt}. Therefore, for most experiments the hexahistidine tag was not removed.

The complex between GDI (with an N-terminal FLAG) and geranylgeranylated Rac1-GDP (with an N-terminal His₆ tag) was expressed in yeast cells and purified by affinity chromatography as described (18, 19). Non-prenylated human Rac1-GDP was expressed in *E. coli* as a glutathione *S*-transferase fusion and purified using glutathione-agarose beads followed by glutathione *S*-transferase cleavage.

Liposome Preparation—Stock solutions of lipids in chloroform were mixed in a 20 ml pear-shaped glass container. The fluorescent lipid nitrobenzoxadiazol-PE was added at 1 mol % as a tracer. The solvent was removed using a rotary evaporator. The lipid film was resuspended in 20 mM Hepes (pH 7.5) and 180 mM sucrose. After five cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing in a water bath (30 °C), the liposome suspension was extruded 21 times through a 0.4- μ m pore-sized polycarbonate filter using a mini-extruder from Avanti Polar Lipids. External sucrose was eliminated by dilution in a buffer containing 20 mM Hepes (pH 7.5) and 100 mM KCl and by centrifugation (400,000 \times *g* for 15 min at 25 °C). The liposomes were resuspended at a final lipid concentration of 10 mM in the same buffer and stored under argon at room temperature before use.

Liposome Binding Experiments—Protein and liposomes were mixed at a final concentration of 1 μ M and 3 mM, respectively, in buffer A (20 mM Hepes, pH 7.5, 100 mM KCl, and 1 mM dithiothreitol) supplemented with 1 mM MgCl₂ and 1 mM MnCl₂ (total volume 50 μ l). After 5 min at 30 °C, the sample was centrifuged at 400,000 \times *g* for 20 min. The lipid pellet was resuspended in the same volume of buffer. Proteins in the pellet and in the supernatant were visualized by Sypro Orange staining after SDS-PAGE using a fluorescence imaging system (LAS 3000, Fujifilm). As a control, a centrifugation experiment was performed in the absence of liposomes to determine the background level of protein, which sediments. Only experiments in which this level was <5% were considered. Therefore, the liposome binding values reported here are significant over the 5–100% range.

GDI Removal Protocol—The complex between GDI and Rac-GDP (1 μ M) was incubated for 40 min at 30 °C with liposomes (6 mM lipids) and 20 μ M GTP in buffer A supplemented with 1 mM MgCl₂ and 2 mM EDTA to give a [Mg²⁺]_{free} of 1 μ M. The sample was centrifuged at 400,000 \times *g* for 20 min at 4 °C. The pellet was washed with cold buffer A ([Mg²⁺]_{free} = 1 μ M), centrifuged again for 5 min at 4 °C, and resuspended in buffer A supplemented with 1 mM MgCl₂ and no EDTA ([Mg²⁺]_{free} = 1 mM). The Rac-loaded liposomes were then incubated at 30 °C for 30 min to promote GTP hydrolysis on Rac and stored on ice before use. Aliquots (20 μ l) from the initial lipid/protein suspension, the supernatants, and the final liposome suspension were withdrawn and analyzed by fluorometry and SDS-PAGE to determine liposome and protein recovery.

Rac Glucosylation—Glucosylation reactions were performed at 30 °C. [¹⁴C]UDP-glucose (10 μ M) was used as a glucose donor. Liposome-bound Rac-GDP, which was obtained by the GDI removal protocol, was diluted 2-fold in buffer A supplemented with 1 mM MgCl₂ and 1 mM MnCl₂ to give a final lipid concentration of 3 mM and a final protein concentration of ~0.25 μ M (as estimated by SDS-PAGE). Glucosylation was initiated by the addition of LT. At the indicated times,

20- μ l aliquots were withdrawn, diluted in 2 ml of ice-cold buffer (20 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM KCl, and 10 mM MgCl₂), and filtered on 25-mm BA85 nitrocellulose filters (Schleicher & Schüll). After two additional washes with 2 ml of ice-cold buffer, the filters were dried and counted.

Limited Proteolysis—An LT cytosolic fragment (200 μ g/ml) was incubated at 30 °C with trypsin (0.5 μ g/ml) in buffer A supplemented with 1 mM MgCl₂ and 1 mM MnCl₂. At the indicated times, the reaction was stopped by the addition of 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and analyzed by SDS-PAGE using Sypro Orange staining.

Cell Microinjection—NIH-3T3 cells were plated at low confluency on 13-mm glass coverslips for 48 h in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, penicillin G (100 units/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) (Invitrogen). Cytosolic microinjection (Eppendorf 5171 microinjector) was performed with the indicated toxin (50 μ g/ml) and with dextran-TRITC (1 mg/ml) in phosphate-buffered saline. After a 3-h incubation at 37 °C the cells were fixed with a solution of 3.7% paraformaldehyde, and the polymerized actin was stained with phalloidin-fluorescein isothiocyanate (Molecular Probes, Leiden, Netherlands). The glass coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem and VWR International) and observed by fluorescence microscopy using a confocal laser-scanning microscope (Leica).

RESULTS

In pilot experiments we tested the susceptibility of liposome-bound geranylgeranylated Rac-GDP to glucosylation by full-length LT using liposomes made of a crude mixture of soybean lipids (azolectin). We observed that the rate of glucosylation largely exceeded the rate observed in solution using *E. coli*-expressed, non geranylgeranylated Rac-GDP, the substrate that is classically used in *in vitro* experiments. This finding suggested that the lipid bilayer provided a favorable environment for the glucosylation reaction. This hypothesis was also supported by experiments using membranes from cells overexpressing Ras, which showed that detergents such as Triton X-100, at a concentration that did not modify the glucosylation of soluble substrates, strongly inhibited the glucosylation of Ras by LT (data not shown).

These preliminary observations prompted us to examine the lipid binding properties of LT and notably that of the N-terminal domain, because this domain is released into the cytosol by proteolysis and glucosylates cellular substrates such as Rac or Ras.

Lipid Binding Properties of the Various Domains of LT—To assess the lipid binding properties of LT, we performed sedimentation experiments using sucrose-loaded liposomes of defined composition. Liposome-bound and unbound proteins were separated by centrifugation and quantified by fluorometry after SDS-PAGE using Sypro Orange staining. The liposome composition was based on a background of neutral lipids consisting of PC (30–60%), PE (20%), and cholesterol (20%). When indicated, anionic lipids such as PS, PG, PA, or PI were included at the expense of PC.

Fig. 1 compares the lipid binding properties of full-length LT with that of its N-terminal cytosolic domain (amino acids 1–546) or its C-terminal “receptor binding” domain (amino acids 1852–2366). These two latter forms were expressed in *E. coli* with an N-terminal hexahistidine tag. Full-length LT bound completely to all liposomes tested, including neutral PC/PE/cholesterol liposomes (Fig. 1B). In contrast, the C-terminal domain showed no binding to liposomes, either neutral or anionic (Fig. 1C). Interestingly, the N-terminal cytosolic domain (hereafter abbreviated as LT_{cyt}) bound weakly (15%) to neutral PC/PE/cholesterol liposomes but showed better binding to liposomes containing anionic lipids (Fig. 1D). Of all the anionic lipids tested, PS, the major anionic lipid of eukaryotic cell membranes, was the most potent. At 30 mol % PS, ~80% of LT_{cyt} was recovered in the liposome pellet (Fig. 1D). PG, which is abundant in bacterial membranes, and PIP₂, which is present at low amount in cell membranes, induced a moderate binding of LT_{cyt}. Other anionic lipids, including PA and PI, were less potent (Fig. 1D). Similar lipid binding properties

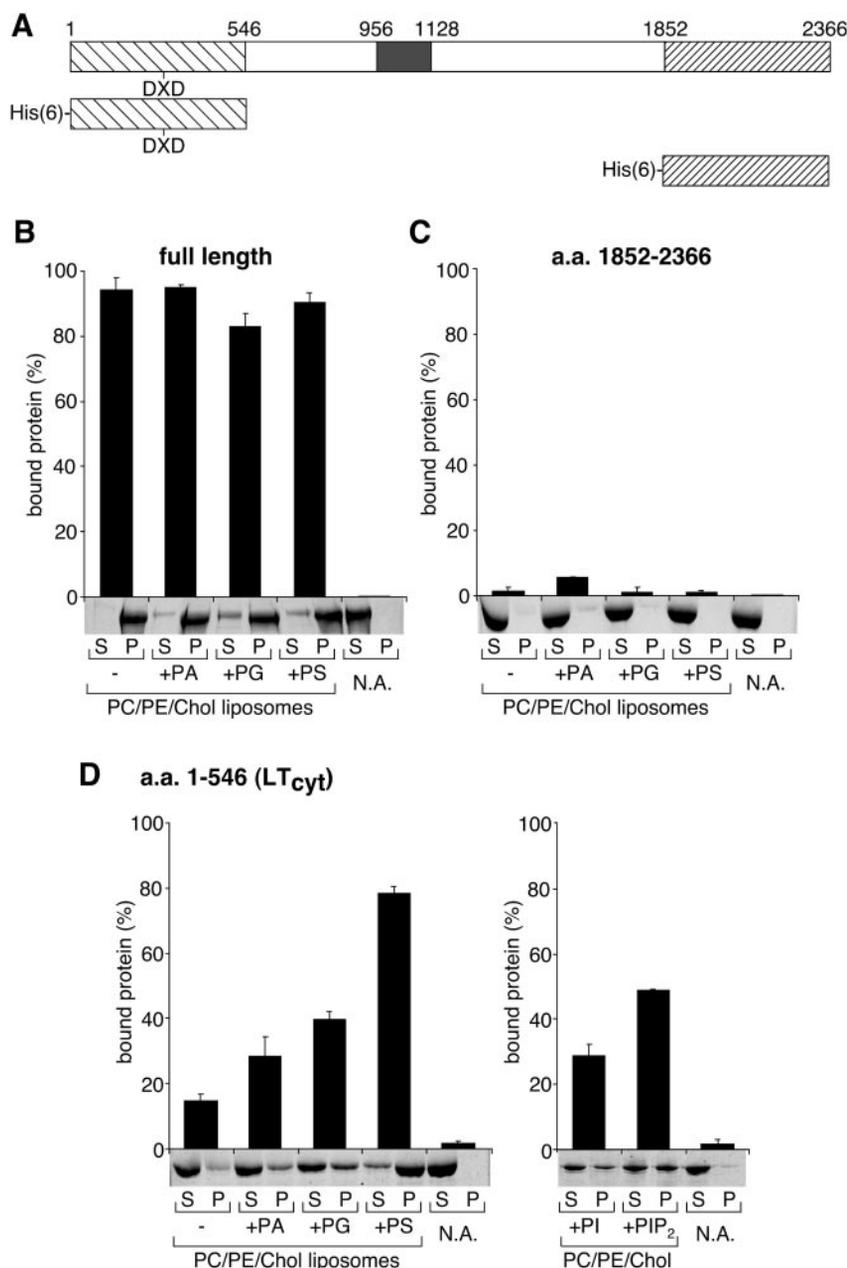


FIG. 1. Lipid binding properties of LT, its receptor binding domain, and its cytosolic domain. The constructions used are schematized in *panel A*. The DXD motif in the cytosolic domain, which is essential for the glucosyltransferase activity, is indicated. Purified full-length LT (*panel B*), its C-terminal receptor binding domain (*panel C*), or its N-terminal cytosolic domain LT_{cyt} (*panel D*) was incubated with or without PC/PE/cholesterol (*Chol*) liposomes supplemented with PA, PG, PS, PI, or PIP₂ as indicated. All anionic lipids were used at 30 mol % except PIP₂, which was used at 5 mol %. After incubation, the samples were centrifuged, and the supernatant (S) and the pellet (P) were analyzed by SDS-PAGE and Sypro Orange staining. The protein concentration was 1 μ M, and the lipid concentration was 3 mM. The experiments have been repeated two or three times with different preparations of liposomes. The histograms show the mean \pm S.E. of these independent experiments. *a.a.*, amino acids. *N.A.*, no addition of liposomes.

were observed after removal of the N-terminal hexahistidine tag (data not shown). Taken together, these experiments show that LT displays complex lipid binding properties that are related to its composite domain organization. The central hydrophobic “translocation” domain probably accounts for the strong avidity of full-length LT for all liposomes (Fig. 1B). More intriguing was the binding of the cytosolic domain to PS-containing liposomes (Fig. 1D) insofar as PS is abundant in the cytosolic leaflet of cell membranes and notably the plasma membrane, where small G proteins such as Ras or Rac are found.

Phosphatidylserine Facilitates Glucosylation of Liposome-bound Rac by LT—Next, we wished to test the effect of PS on the glucosylation of liposome-bound Rac-GDP by LT. For this task, it was first necessary to assess the minimal lipid composition required to prepare liposome-bound Rac.

Geranyl-geranylated Rac-GDP was purified as a 1:1 soluble complex with GDI. To prepare liposome-bound Rac-GDP, we used a GDI removal protocol that takes advantage of the transient displacement of Rac from GDI and its binding to liposome

during a single round of GTP binding and hydrolysis (19). The rationale of this protocol is that the replacement of GDP by GTP weakens the interaction of Rac with GDI and thus facilitates the association of Rac with liposomes. Liposome-bound Rac-GTP can then be separated from soluble GDI by centrifugation and subsequently incubated with a millimolar concentration of magnesium to promote the conversion to the GDP-bound form because of the GTPase activity of Rac (19). Fig. 2A shows that under conditions favoring GDP to GTP exchange (low Mg²⁺ concentration), Rac accumulates strongly and with similar efficiency to all liposomes containing 30 mol % anionic lipids but not to neutral PC/PE/cholesterol liposomes. This finding suggested that nonspecific electrostatic interactions with anionic lipids contribute to the translocation of geranylgeranylated Rac from GDI to lipid membranes during GDP to GTP exchange. It is likely that these interactions involve a cluster of six basic residues adjacent to the C-terminal geranylgeranylated cysteine of Rac. The juxtaposition of basic residues with a lipid modification helps to anchor many proteins to lipid membranes, including prenylated small G proteins (20–25).

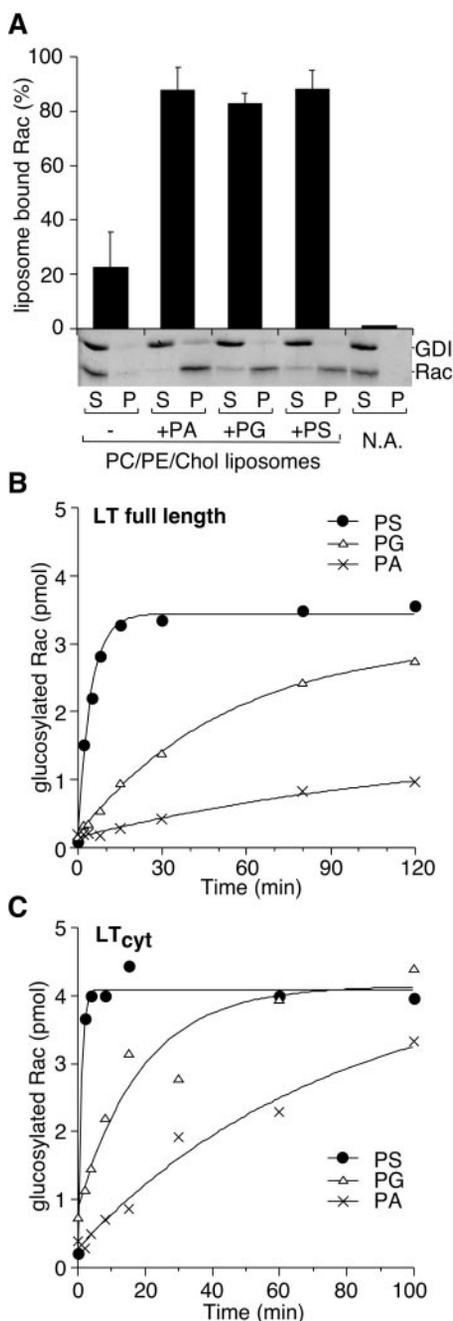


FIG. 2. Phosphatidylserine facilitates the glucosylation of liposome-bound Rac-GDP by LT. A, preparation of liposome-bound Rac. The complex between Rac-GDP and GDI ($1 \mu\text{M}$) was incubated for 40 min at 30°C with GTP ($20 \mu\text{M}$) and with or without PC/PE/cholesterol liposomes supplemented with 30 mol % PA, PG, or PS as indicated. The concentration of free Mg^{2+} was $1 \mu\text{M}$. After incubation, the sample was centrifuged, and the supernatant (S) and the pellet (P) were analyzed by SDS-PAGE and Sypro Orange staining. N.A., no addition of liposomes. B and C, glucosylation experiments. Rac-GTP bound to anionic liposomes was prepared as described for panel A and converted to the GDP-bound state by a further incubation at 1 mM free Mg^{2+} to promote GTP hydrolysis. Glucosylation was initiated by the addition of 1 nM full-length LT (panel B) or 0.25 nM LT_{cyt} (panel C) in the presence of $[^{14}\text{C}]\text{-UDP-glucose}$ ($10 \mu\text{M}$). Protein-bound radioactivity was determined on $20 \mu\text{l}$ aliquots ($\sim 5 \text{ pmol}$ of Rac per aliquot). Continuous traces represent best single exponential fits.

Having established that liposome-bound Rac-GDP could be prepared on any anionic liposome, we conducted glucosylation reactions. We observed that the nature of the anionic lipid present in the liposomes had a dramatic effect on the rate of Rac-GDP glucosylation by full-length LT (Fig. 2B) as well as by

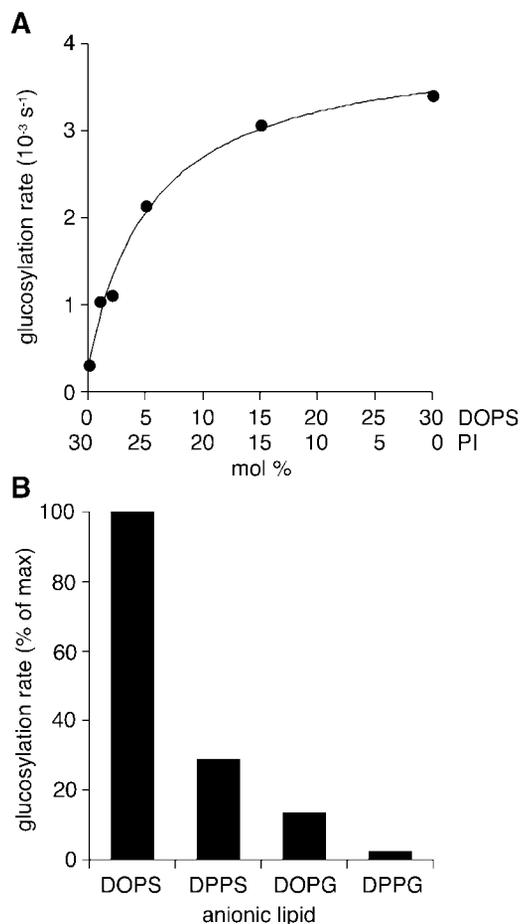


FIG. 3. Dose-response curve for the effect of PS on LT_{cyt} and the effect of acyl chain unsaturation. A, PC/PE/cholesterol liposomes containing increasing amount of dioleoyl-PS at the expense of PI (total anionic lipids = 30%) were loaded with Rac-GDP using the GDI removal protocol. Rac-GDP was then glucosylated by LT_{cyt} as in Fig. 2C, and the apparent rate constant of the reaction was plotted as a function of the surface concentration of dioleoyl-PS (DOPS). B, comparison of the relative glucosylation rate of liposome-bound Rac-GDP by LT_{cyt} on PC/PE/cholesterol liposomes containing dioleoyl-PS (DOPS), dipalmitoyl-PS (DPPS), dioleoyl-PG (DOPG), or dipalmitoyl-PG (DPPG) (30 mol %).

LT_{cyt} (Fig. 2C). In both cases, glucosylation proceeded slowly with PA as the sole source of anionic lipid, five times faster with PG, and 60 times faster with PS. Thus, the activity of LT_{cyt} toward liposome-bound Rac-GDP correlated with its lipid binding properties (compare Figs. 2C and 1D). Moreover, despite the fact that full-length LT bound avidly to all liposomes tested (Fig. 1B), its activity also depended on the presence of PS (Fig. 2B), suggesting that PS favors the correct positioning of the cytosolic and glucosyltransferase N-terminal domain toward membrane-bound Rac-GDP.

To further assess the specificity of LT_{cyt} for PS, we conducted glucosylation reactions using liposomes containing increasing amounts of synthetic PS. Because the yield of liposome-bound Rac-GDP obtained by the GDI removal protocol depended on the presence of anionic lipids, PS was added at the expense of another anionic lipid (e.g. PI or PG) to keep constant the total amount of all anionic lipids at 30 mol %. Fig. 3A shows that the rate of Rac glucosylation increased 10-fold when PI was gradually replaced by dioleoyl-(C18:1-C18:1)-PS, with the half-maximal effect observed at 5 mol %. Interestingly, dipalmitoyl-(C16:0-C16:0)-PS was much less potent than dioleoyl-PS (Fig. 3B). A similar effect of acyl chain unsaturation was observed for the less activating lipid species PG (Fig. 3B). Therefore we

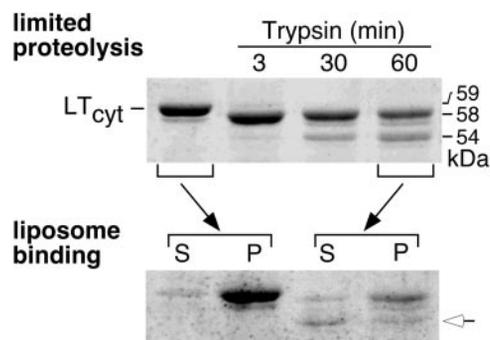


FIG. 4. Limited proteolysis of the cytosolic fragment of LT. LT_{cyt} ($3 \mu\text{M}$) was incubated with trypsin ($0.5 \mu\text{g/ml}$) at 30°C . The reaction was stopped at the indicated times by the addition of phenylmethylsulfonyl fluoride (0.2 mM) and analyzed by SDS-PAGE (top). To analyze the lipid binding properties of the various fragments, aliquots from the proteolysis reaction were diluted 2-fold in buffer A containing PC/PE/cholesterol/PS (30:20:20:30 mol %) liposomes (3 mM lipids). After centrifugation, the pellet (P) and the supernatant (S) were analyzed by SDS-PAGE (bottom). Note that the smallest trypsinized fragment (54 kDa ; white arrow) binds less efficiently to the liposomes as compared with the other fragments.

suggest that lipid packing influences the accessibility of polar head groups to LT_{cyt} .

A Specific Binding Site for Phosphatidylserine in the N Terminus of Lethal Toxin—To search for the presence of subdomains in LT_{cyt} , which are potentially involved in PS binding, we conducted limited proteolysis experiments. LT_{cyt} was relatively resistant to digestion by trypsin, chymotrypsin, and subtilisin (Fig. 4 and data not shown). In all cases, the N-terminal hexahistidine tag used for purification was immediately cleaved (as revealed by Western blot). After 30 min, fragments that displayed an apparent molecular mass of at least 90% of the initial construct were observed. This suggests that LT_{cyt} folds as a single domain probably flanked by somehow flexible short ends. Interestingly, centrifugation experiments revealed that the fragment generated by trypsin treatment that had the lowest molecular mass (apparent molecular mass = 54 kDa) bound less avidly to PS-containing liposomes as compared with the other fragments (Fig. 4). N-terminal sequencing revealed that this fragment starts from the 19th amino acid of LT. Therefore, we constructed an N-terminal truncated version of LT_{cyt} lacking the first 18 amino acids ($[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$) and compared its lipid binding properties with that of LT_{cyt} .

Fig. 5A shows that, in contrast to LT_{cyt} , $[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$ showed no PS-dependent binding to liposomes. Importantly, LT_{cyt} and $[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$ showed the same glucosyltransferase activity on non geranyl-geranylated Rac-GDP in solution, suggesting that residues 1–18 in LT play no role in the glucosyltransferase mechanism *per se* (Fig. 5B). It should be noted that these experiments were performed with an ~ 100 -fold higher concentration of LT_{cyt} and $[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$ as compared with experiments on liposome-bound Rac (see Figs. 2C and 5C), thus illustrating the catalytic advantage provided by the lipid membrane environment. Next, we assessed the activity of $[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$ on liposome-bound Rac-GDP (Fig. 5C). In marked contrast with what was observed for LT_{cyt} , the rate of glucosylation was slow and was not influenced by the nature of the anionic lipid present in the liposomes (compare Figs. 2C and 5C). We concluded from these experiments that the first 18 residues of LT_{cyt} participate in the formation of a PS-specific binding site that helps to anchor the cytosolic domain of LT to lipid membranes, thereby facilitating the glucosylation of membrane-bound Rac.

Amino Acids 1–18 Are Required for the Cytotoxicity of LT_{cyt} —To determine the importance of the N terminus of LT for its cytotoxic effect *in vivo*, we microinjected LT_{cyt} or $[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$

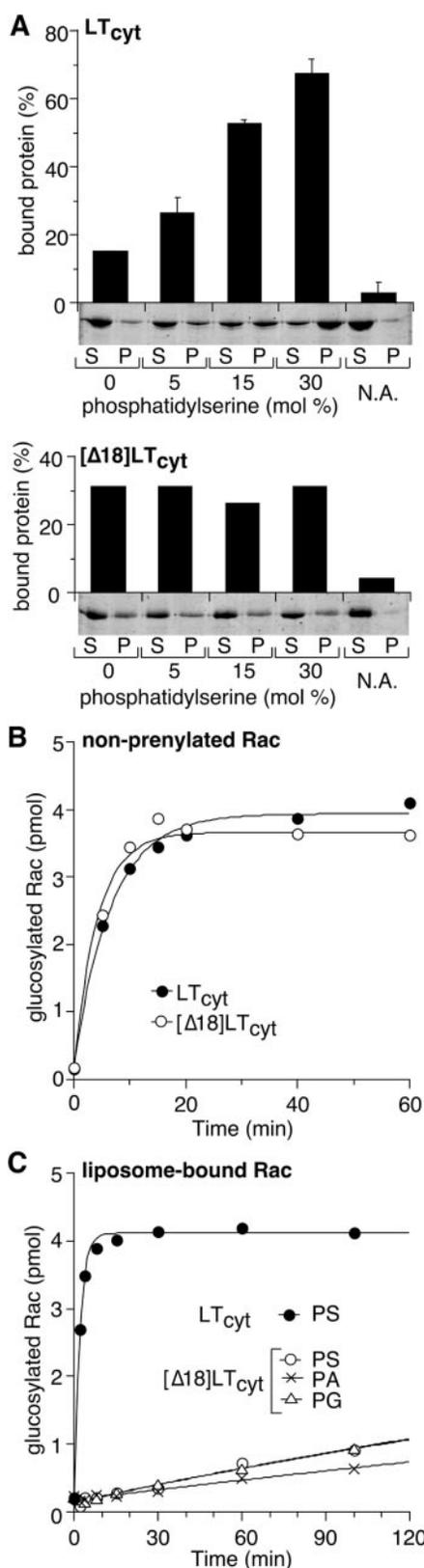


FIG. 5. Deletion of the first 18 amino acids in LT_{cyt} abolishes its sensitivity to phosphatidylserine. A, binding of LT_{cyt} or the $\Delta 18$ truncated form ($[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$) to PC/PE/cholesterol liposomes (3 mM lipids) containing increasing amounts of PS at the expense of PC. S, supernatant; P, pellet. B, time course of glucosylation of non-prenylated Rac ($0.5 \mu\text{M}$) in solution in the presence of 50 nM LT_{cyt} (black circles) or 50 nM $[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$ (white circles). C, glucosylation of geranyl-geranylated Rac ($0.25 \mu\text{M}$) by $[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$ (0.5 nM) on PC/PE/cholesterol liposomes supplemented with 30% PS (white circles), 30% PG (white triangles), or 30% PA (crosses). For comparison, an experiment with 0.5 nM LT_{cyt} on PS-containing liposomes is shown (black circles).

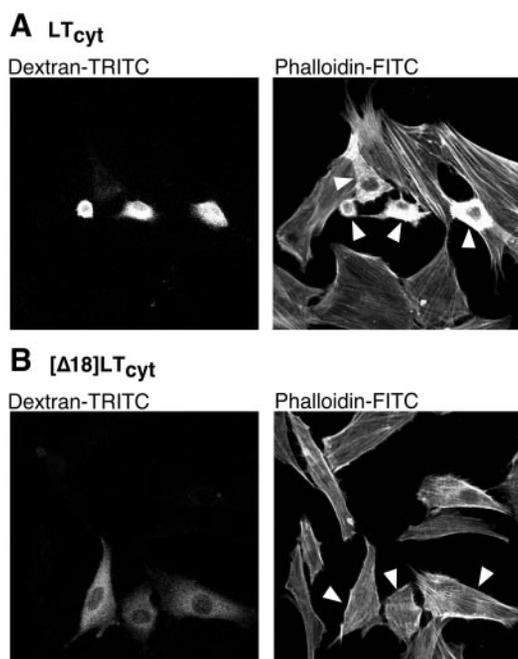


FIG. 6. The cytotoxicity of LT_{cyt} is abolished by the $\Delta 18$ N-terminal truncation. Wild-type LT_{cyt} (A) or the N-terminal truncated form $[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$ (B) was introduced into the cytosol of NIH-3T3 cells by microinjection together with dextran-TRITC as a tracer. After 3 h, the cells were fixed and the actin cytoskeleton labeled with phalloidin-fluorescein isothiocyanate (FITC). Arrows indicate microinjected cells positive for dextran-TRITC.

into various cell types (NIH-3T3, baby hamster kidney, and HeLa). After 3 h the cells were fixed, and the actin cytoskeleton was visualized by phalloidin-fluorescein isothiocyanate. The data for NIH-3T3 cells are shown in Fig. 6, and similar results were observed for the other cell lines. In agreement with previous findings (2), we observed that LT_{cyt} triggered the disassembly of actin stress fibers and the formation of a thick cortical actin cytoskeleton. The cells lost their typical flat morphology and became round and smaller (Fig. 6A). In contrast, the cells microinjected with $[\Delta 18]LT_{\text{cyt}}$ were intact and indistinguishable from non-injected cells (Fig. 6B). Thus, although not involved in the glucosyl-transferase activity *per se*, the N terminus is essential for the cytotoxic activity of LT_{cyt} .

Toxin B from *C. difficile* Is Not Specific for PS—Among the four large Clostridial toxins, toxin B from *C. difficile* is the closest homolog to LT (3). Yet, as illustrated in Fig. 7A, the two toxins show substantial differences in their first 18 residues. Both toxins are rich in hydrophobic and basic residues, but toxin B contains a glutamic acid residue (Glu-10), whereas LT contains no acidic residue. In addition, there are some non-conservative substitutions between polar, charged, and hydrophobic residues (Ala \rightarrow Lys, Val \rightarrow Ala, and Tyr \rightarrow Asn; see Fig. 7A). Fig. 7B shows that the cytosolic domain of toxin B was less sensitive to the anionic composition of liposomes than LT. The time course of Rac glucosylation by the cytosolic domain of toxin B was the same whether PS or PG was included in the liposomes, suggesting that some amino acid differences in the N terminus of LT and toxin B contribute to the striking PS-dependence of LT. In addition, the cytosolic domain of toxin B showed only modest levels of binding to PS-containing liposomes (<30%; data not shown).

DISCUSSION

Membrane association facilitates protein-protein interactions by increasing local concentrations and directing protein orientation. In the case of Rac, membrane association has been

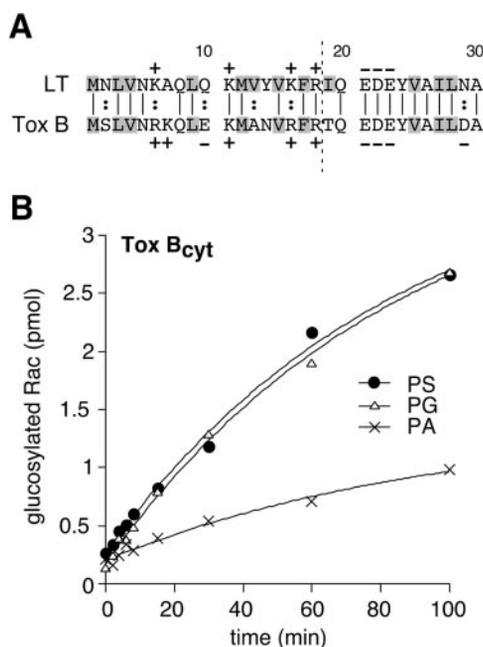


FIG. 7. Comparison of LT with toxin B from *C. difficile*. A, sequence alignment of the N terminus of toxin B (*Tox B*) with that of lethal toxin. Hydrophobic residues (gray background) and charged residues (+ or -) are indicated. B, glucosylation of liposome-bound Rac-GDP by the cytosolic fragment of toxin B (*Tox B_{cyt}*) on PC/PE/cholesterol liposomes supplemented with 30% PS, PG, or PA.

shown to favor the catalysis of GDP/GTP exchange by guanine nucleotide exchange factors and GTP hydrolysis by GTPase-activating proteins (19, 26, 27). Here we show that the cytosolic domain of a bacterial toxin also takes advantage of the lipid environment to inactivate Rac. The catalytic domain of LT, which is released into the cytosol after cell infection, glucosylates the small G protein Rac-GDP much more efficiently in a minimal lipid environment than in solution. With an optimal lipid composition, the “kinetics gain” provided by the membrane environment results in at least a 100-fold increase in the rate of Rac glucosylation by LT_{cyt} . Indeed, whereas non-prenylated Rac-GDP was glucosylated by 50 nM LT_{cyt} with a half-time of 5 min in solution (Fig. 5B), only 0.25–0.5 nM LT_{cyt} was needed to achieve a similar time course on geranyl-geranylated Rac-GDP bound to PC/PE/cholesterol/PS liposomes (Figs. 2C and 5C). Because the lipid binding properties of LT_{cyt} correlate with its glucosyltransferase activity on liposome-bound Rac (Figs. 1D and 2C), we suggest that the modulation of LT_{cyt} activity by membrane lipids results from an increase in the local concentration of LT_{cyt} . Recent studies suggest that other protein toxins use membrane-partitioning mechanisms to act efficiently on membrane-associated proteins (28–30). Clostridial neurotoxins, which cleave the cytosolic domain of the transmembrane SNARE proteins, act more efficiently in the presence of negatively charged lipids (28). The tarantula venom toxin VTX1 partitions into the membrane through a hydrophobic surface and thereby inhibits efficiently voltage-dependent ion channels despite a weak protein-protein interaction (30).

LT_{cyt} shows a marked preference for PS as compared with other anionic lipids, including PG, PA, and phosphoinositides (Figs. 1D, 2C, and 3). PS is the most abundant anionic lipid in eukaryotic cells and is enriched in the cytosolic leaflet of cellular membranes, notably at the plasma membrane (31). The specificity of LT_{cyt} for PS thus provides a straightforward mechanism for targeting the glucosyltransferase domain to prenylated and membrane-associated small G proteins. In addition, the low abundance of PS in the outer leaflet of the

plasma membrane should prevent the glucosyltransferase domain from interfering with key membrane binding events that occur early during LT infection, including the recognition of cell surface receptors by the C-terminal domain and the translocation of the central hydrophobic domain through the endosomal membrane.

Removal of the first 18 N-terminal residues of LT_{cyt} was sufficient to abolish the effect of PS on LT_{cyt} binding to liposomes (Fig. 5A) and on the LT-catalyzed glucosylation of liposome-bound Rac (Fig. 5C). However the N-terminal truncation had no effect on LT_{cyt} activity on soluble recombinant Rac (Fig. 5B), suggesting that the lipid binding motif of LT_{cyt} is not structurally coupled to the catalytic and Rac-binding domains, which have been localized, respectively, in the central and the C-terminal region of LT_{cyt} (3, 32, 33). The N terminus of LT_{cyt} contains four basic residues, eight hydrophobic residues, and no acidic residues (Fig. 7A) and is therefore adapted to interact with negatively charged lipid membranes. Because this region is highly sensitive to proteolysis (Fig. 4A), we suggest that it forms a flexible chain that adsorbs at the surface of negatively charged membranes. Experimental and theoretical studies on proteins and model peptides have detailed the various combinations of electrostatic and hydrophobic forces that allow membrane adsorption of basic/hydrophobic clusters (21, 22). When electrostatic interactions prevail, the basic cluster remains at some distance from the lipid polar heads because of the energy cost of desolvating charged groups. The interaction is thus nonspecific, and anionic lipids with the same net charge such as PS and PG are interchangeable in promoting membrane adsorption. However, when hydrophobic residues act in concert with basic residues, they lead to a deeper penetration of the protein region within the lipid polar head region and thus may impose some specificity toward given lipid head groups. The fact that LT_{cyt} interacts preferentially with liposomes having anionic lipids with unsaturated acyl chains also argues for a deep membrane adsorption (Fig. 3B). Interestingly the cytosolic domain of *C. difficile* toxin B did not show a marked preference for PS (Fig. 7). Although highly homologous, lethal toxin and toxin B show a few substitutions in their N-terminal sequence between charged, polar, and hydrophobic residues (Fig. 7A). Mutagenesis and structural studies should help to further characterize the PS-binding site of LT.

Acknowledgments—We thank Bernard Hautecoeur for initiating this work, Nathalie Lerouquier for N-terminal sequencing, Maria Partisani for assistance with cell studies, and Sonia Paris, Pierre Chardin, and

Lochlan Rash for comments on the manuscript.

REFERENCES

- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., von Eichel-Streiber, C., Mann, M., and Aktories, K. (1995) *Nature* **375**, 500–503
- Popoff, M. R., Chaves-Olarte, E., Lemichez, E., von Eichel-Streiber, C., Thelestam, M., Chardin, P., Cussac, D., Antonny, B., Chavrier, P., Flatau, G., Giry, M., de Gunzburg, J., and Boquet, P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 10217–10224
- Busch, C., and Aktories, K. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 528–535
- Sehr, P., Joseph, G., Genth, H., Just, I., Pick, E., and Aktories, K. (1998) *Biochemistry* **37**, 5296–5304
- Herrmann, C., Ahmadian, M. R., Hofmann, F., and Just, I. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 16134–16139
- Vetter, I. R., Hofmann, F., Wohlgemuth, S., Herrmann, C., and Just, I. (2000) *J. Mol. Biol.* **301**, 1091–1095
- Just, I., Hofmann, F., and Aktories, K. (2000) in *Bacterial Protein Toxins* (Aktories, K., and Just, I., eds), pp. 307–331, Springer, Berlin
- Qa'Dan, M., Spyrès, L. M., and Ballard, J. D. (2000) *Infect. Immun.* **68**, 2470–2474
- Barth, H., Pfeifer, G., Hofmann, F., Maier, E., Benz, R., and Aktories, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10670–10676
- Qa'Dan, M., Spyrès, L. M., and Ballard, J. D. (2001) *Infect. Immun.* **69**, 5487–5493
- Hofmann, F., Busch, C., Prepens, U., Just, I., and Aktories, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11074–11078
- Pfeifer, G., Schirmer, J., Leemhuis, J., Busch, C., Meyer, D. K., Aktories, K., and Barth, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 44535–44541
- Genth, H., Aktories, K., and Just, I. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 29050–29056
- Hoffman, G. R., Nassar, N., and Cerione, R. A. (2000) *Cell* **100**, 345–356
- Scheffzek, K., Stephan, I., Jensen, O. N., Illenberger, D., and Gierschik, P. (2000) *Nat. Struct. Biol.* **7**, 122–126
- Grizot, S., Faure, J., Fieschi, F., Vignais, P. V., Dagher, M. C., and Pebay-Peyroula, E. (2001) *Biochemistry* **40**, 10007–10013
- Popoff, M. R. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 35–43
- Read, P. W., and Nakamoto, R. K. (2000) *Methods Enzymol.* **325**, 15–25
- Robbe, K., Otto-Bruc, A., Chardin, P., and Antonny, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 4756–4762
- Bhatnagar, R. S., and Gordon, J. I. (1997) *Trends Cell Biol.* **7**, 14–20
- Murray, D., Ben-Tal, N., Honig, B., and McLaughlin, S. (1997) *Structure* **5**, 985–989
- Murray, D., Arbuzaova, A., Honig, B., and McLaughlin, S. (2002) in *Current Topics in Membranes* (Simon, S. A., and McIntosh, T. J., eds) Vol. 52, pp. 277–307, Academic Press, New York
- Ghomashchi, F., Zhang, X., Liu, L., and Gelb, M. H. (1995) *Biochemistry* **34**, 11910–11918
- Leventis, R., and Silvius, J. R. (1998) *Biochemistry* **37**, 7640–7648
- Roy, M. O., Leventis, R., and Silvius, J. R. (2000) *Biochemistry* **39**, 8298–8307
- Rossman, K. L., Cheng, L., Mahon, G. M., Rojas, R. J., Snyder, J. T., Whitehead, I. P., and Sondek, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 18393–18400
- Molnar, G., Dagher, M. C., Geiszt, M., Settleman, J., and Ligeti, E. (2001) *Biochemistry* **40**, 10542–10549
- Caccin, P., Rossetto, O., Rigoni, M., Johnson, E., Schiavo, G., and Montecucco, C. (2003) *FEBS Lett.* **542**, 132–136
- Fernandez-Salas, E., Steward, L. E., Ho, H., Garay, P. E., Sun, S. W., Gilmore, M. A., Ordas, J. V., Wang, J., Francis, J., and Aoki, K. R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3208–3213
- Lee, S. Y., and MacKinnon, R. (2004) *Nature* **430**, 232–235
- Sprong, H., van der Sluys, P., and van Meer, G. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 504–513
- Busch, C., Hofmann, F., Selzer, J., Munro, S., Jeckel, D., and Aktories, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19566–19572
- Hofmann, F., Busch, C., and Aktories, K. (1998) *Infect. Immun.* **66**, 1076–1081

ARTICLE ANNEXE 2 :

GEF and glucosylation assays
on liposome-bound Rac

Bruno Mesmin, Bruno Antony

[6] GEF and Glucosylation Assays on Liposome-Bound Rac

By BRUNO MESMIN and BRUNO ANTONNY

Abstract

Rac binds tightly to lipid membranes through a lipid modification. The influence of the lipid membrane environment on the multiple interactions of Rac has not been well documented. In this chapter, we detail a method to prepare geranyl-geranylated Rac bound to liposomes of defined composition. With this method, one can dissect some lipid-protein interactions that facilitate the interaction of Rac with other proteins such as guanine nucleotide exchange factors and bacterial toxins.

Introduction

The small G protein Rac is modified at its C-terminus by a geranyl-geranyl group, a long 20-carbon isoprenene, which binds avidly to lipid membranes. Experiments with model lipopeptides have shown that the membrane/water-partitioning coefficient of the geranyl-geranyl group is in the range of 10^{-6} M (Silvius and l'Heureux, 1994). This implies that at the millimolar concentration of lipids "seen" by a protein in a cell, a geranyl-geranylated protein, should be membrane associated.

If geranyl-geranylated Rac and other Rho proteins are intrinsically nonsoluble, they can form a cytosolic soluble complex with GDI, a protein that masks the lipid modification (Hoffman *et al.*, 2000). Importantly, GDI also masks the switch regions, which are essential for the interaction of small G proteins with other proteins such as guanine nucleotide exchange factors (GEFs), effectors, and GTPase activating proteins (GAPs). Rac in complex with GDI is, therefore, functionally "inert" in contrast to membrane-associated Rac. For practical reasons, however, most *in vitro* studies are carried out in solution using nonprenylated Rac expressed in *Escherichia coli*. Although such studies provide detailed mechanistic information, particularly with the resolution of protein structures, it is likely that the lipid membrane environment influences the cross-talk between Rac and its partners.

Here we describe a protocol to prepare liposome-bound geranyl-geranylated Rac in the desired conformation (GDP or GTP) and on liposomes of defined composition. Two examples will be presented that

illustrate the dramatic effect of the lipid membrane environment on the interaction of prenylated Rac with other proteins.

Liposome Preparation

It should be noted that a recent volume of *Methods in Enzymology* (vol. 372) is dedicated to the preparation and characterization of liposomes.

Azolectin Liposomes

Azolectin is a soybean lipid extract (type II S, Sigma). Its exact composition is not known, but it is much cheaper than pure lipids. Many membrane-associated proteins readily adsorb on azolectin liposomes. To determine whether a membrane environment provides a kinetic advantage in the interaction between two proteins, it is a good idea to perform pilot experiments with azolectin liposomes before dissecting the contribution of various lipids using liposomes of defined composition. Azolectin liposomes are prepared by the phase-reversion method (Duzgunes, 2003; Szoka and Papahadjopoulos, 1978). Azolectin is dissolved in diethylether (6 ml/20 mg of azolectin lipids) in a 100-ml round-bottom glass flask. Addition of 1 ml sucrose buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 180 mM sucrose), nonmiscible in ether, leads to the formation of two phases. The mixture is sonicated at 4° during 2 min in a bath sonicator to obtain an emulsion in which small droplets of water are separated from the ether phase by a lipid monolayer (inverted micelles). Ether is then gently evaporated in a rotary evaporator (100 rpm) under vacuum at 25° to promote the coalescence of the inverted micelles into unilamellar liposomes. After 5 min, a viscous gel forms and falls down when most solvent is evaporated. The suspension is collected in an Eppendorf tube and incubated in a vacuum chamber for 15 min to remove residual traces of solvent. The solution can be completed up to 1 ml with sucrose buffer. Liposomes are finally sized by extrusion.

Liposomes of Defined Lipid Composition

Lipids are purchased as chloroform solutions from Avanti polar lipids (www.avantilipids.com) or from Sigma and stored at -20° under argon in small (2-ml) glass vials with a Teflon cap. To prepare liposomes of defined lipid composition, lipids are mixed at the desired molar ratio in a pear-shaped glass flask. The fluorescent lipid nitrobenzoxadiazol-PE (www.probes.com) is added at 0.2–1 mol% as a tracer. The total amount of lipid ranges from 1–5 mg. The solvent is evaporated in a rotatory evaporator (500 rpm) under vacuum at 25°. A lipid film rapidly forms at the glass surface. After 15 min, the evaporator is purged with argon, and the dried

lipid film is placed in a vacuum chamber for 30 min. The film is gently resuspended at 1–4 mg/ml in sucrose buffer to obtain multilamellar vesicles, and the suspension is collected in an Eppendorf tube. After five cycles of freezing/thawing in liquid nitrogen and hot water (40°), the liposome suspension is stored at –20°.

Liposome Extrusion

The procedure for the extrusion of liposomes has been described elsewhere (MacDonald *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1986; Mui *et al.*, 2003). There are two commercially available hand extruders with similar design, one from Avanti polar lipids (www.avantilipid.com) and one from Avestin (www.avestin.com). A polycarbonate filter (diameter, 19 mm; pore size, 0.4 μm) is tightly sandwiched between two Teflon parts in a metal holder. Using Hamilton syringes, one manually forces the liposome suspension to pass 19 times through the filter. After extrusion, external sucrose can be removed by diluting the suspension fivefold in an iso-osmotic buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM KCl) and centrifuged at 100,000 rpm (400,000g) for 15 min in a TLA100.3 rotor. The liposome pellet is resuspended at 1–5 mg/ml in the same buffer. Liposomes are stored at room temperature under argon and used within 3 days.

Buffers and Proteins

Guanine nucleotide exchange reactions are performed in 20 mM HEPES–KOH (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , and 1 mM dithiothreitol (DTT) (buffer A). Glucosylation assays are performed in 20 mM HEPES–KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM DTT (buffer B), supplemented with 1 mM MnCl_2 . For unknown reason, the substitution of KCl for NaCl increases the binding of lethal toxin to lipid membranes. The assay buffer should be iso-osmotic with the sucrose buffer to protect liposomes from leakage (100 mM NaCl is iso-osmotic with 180 mM sucrose). If the ionic strength of the assay buffer has to be changed, we recommend adjusting the concentration of sucrose in the buffer used for the preparation of liposomes accordingly. A table for the osmolarity of saline and sucrose solutions can be found in the *Handbook of Chemistry and Physics* (Weast, 1989). It should be noted that MgCl_2 and MnCl_2 , which are present in the assay buffer, are omitted in the liposome buffer, because divalent cations are known to promote long-term fusion of liposomes. Mn^{++} is a cofactor of glucosyltransferase enzymes, whereas Mg^{++} is critical for efficient binding of guanine nucleotides to small G proteins. This feature is used to promote or block guanine nucleotide exchange in small G proteins (see later).

Geranyl-geranylated Rac1 (with an N-terminal hexahistidine tag) is coexpressed with RhoGDI-1 (containing an N-terminal FLAG) in *Saccharomyces cerevisiae* and purified as described for RhoA/GDI (Read and Nakamoto, 2000; Read *et al.*, 2000). Unprenylated Rac1-GDP fused to glutathione S-transferase (GST), His-tagged Tiam DH-PH (amino-acids 1033–1406), and His tagged lethal toxin LT_{cyt} (a.a 1–546) are expressed in *E. coli* and purified on glutathione–agarose beads (Amersham Biosciences) or on Ni²⁺–agarose beads (Qiagen) according to the manufacturer protocols.

GDI-Removal Protocol

General Description

The GDI-removal protocol enables preparation of liposome-bound geranyl-geranylated Rac in the absence of detergent. This protocol is based on the reduced affinity of GDI for Rac-GTP compared with the GDP-bound form (Robbe *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 1993).

The Rac-GDP/GDI complex (1 μM) is mixed with liposomes (6 mM lipids) and with 20 μM GTP in buffer A or B, depending on the assay chosen. EDTA (2 mM) is added from a 100 \times stock solution at pH 7 to give 1 μM free Mg²⁺, and the suspension is incubated for 40 min at 30° in a Thermomixer (800 rpm; Eppendorf) (Fig. 1, stage 1). At this low Mg²⁺ concentration, GDP dissociates within minutes and is replaced by the

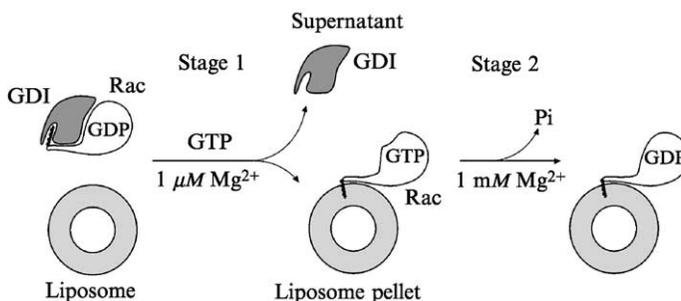


FIG. 1. GDI-removal protocol. During the first stage, the Rac-GDP-GDI complex is incubated with liposomes and with GTP and EDTA to promote the formation of membrane-bound Rac-GTP. Liposomes are then collected by centrifugation and washed to separate membrane-bound Rac-GTP from soluble GDI and excess GTP. In the second stage, the lipid pellet is resuspended in a buffer containing 1 mM MgCl₂ and incubated at 30° to allow Rac to hydrolyze the bound GTP. Adapted from Robbe *et al.* (2003).

added nucleotide (here GTP). The binding of GTP shifts the partitioning equilibrium of Rac toward the liposome-bound form at the expense of the GDI-bound form. After incubation, the sample is centrifuged at 100,000 rpm (400,000g) in a Beckman TLA 100.1 rotor for 20 min at 4°. The supernatant is removed, and the liposome pellet is gently washed (but not resuspended) with cold buffer A or B, supplemented with 2 mM EDTA ($[\text{Mg}^{2+}]_{\text{free}} = 1 \mu\text{M}$). The sample is centrifuged again for 5 min at 4°, and the pellet is finally resuspended in buffer A or B ($[\text{Mg}^{2+}]_{\text{free}} = 1 \text{mM}$) and incubated for 30 min at 30° to promote GTP hydrolysis (Fig. 1, stage 2). The half time of GTP hydrolysis in Rac at 1 mM Mg^{2+} and at 30° is about 8 min. The final liposome suspension, which contains membrane-bound Rac-GDP, is stored on ice before use. To assess the efficiency of the GDI-removal protocol, aliquots of the initial lipid/protein suspension, of the supernatant, and of the final liposome suspension are analyzed by SDS-PAGE. This analysis can be performed with Coomassie staining, but we recommend the use of the fluorescent dye Sypro Orange (Molecular probes; www.probes.com). This probe can be visualized and quantified in a fluorescence imaging system such as the LAS 3000 (Fuji), which consists of a black box with blue diodes for excitation (460 nm), a filter wheel (with a 515 nm DI filter for sypro orange and NBD fluorescence), and a CCD camera. The digitalized images are analyzed using the Aida software (Fuji). This method is more sensitive and more linear than Coomassie staining. Typically, almost 90% of GDI are found in the first supernatant after the GTP-binding stage, whereas 50–80 % of Rac are found associated with liposomes after the GTP hydrolysis stage (Robbe and Antonny, 2003). The lipid probe (NBD-PE excitation 465 nm; emission 535 nm) can be also visualized and quantified in the fluorescence imaging system. For this, we deposit small drops (10 μl) of the various fractions on a black plastic plate and take a picture of the plate.

The GDI-removal protocol can be modified in various ways. First, a nonhydrolyzable analog of GTP (such as $\text{GTP}\gamma\text{S}$) can be used to obtain liposome-bound Rac in a permanently active form. Second, the concentration of liposome can be varied. However the efficiency of Rac translocation strongly decreases at lipid concentration $<0.5 \text{mM}$. Third, and as detailed later, the GDI-removal protocol can be performed with liposomes of various compositions.

Optimal Lipid Composition

GDI contains not only a hydrophobic pocket that shields the geranylgeranyl group from the solvent but also a cluster of acidic residues that interact electrostatically with the C-terminal polybasic region of Rac

(Hoffman *et al.*, 2000). Therefore, the presence of anionic lipids is required to displace Rac from GDI in the GDI-removal protocol (Mesmin *et al.*, 2004). Figure 2A shows that under conditions that favor GDP–GTP exchange (low Mg^{2+} concentration), Rac accumulates strongly and with similar efficiency to all liposomes containing 30 mol% anionic lipids but not to neutral liposomes. Dose-response curves for the anionic lipids phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) are shown in Fig. 2B.

In summary, the partitioning of Rac between GDI and liposomes in the GDI-removal protocol is governed by three parameters: the conformation of Rac, the concentration of lipids, and the percentage of anionic lipids. For efficient translocation of Rac, it is thus critical (1) to use high lipid concentration (in the millimolar range); (2) to add GTP and to transiently lower the concentration of Mg^{++} in the micromolar range using EDTA; and (3) to include anionic lipids in the liposome formulation. However, the nature of the anionic lipid is not important, because the interaction with the polybasic tail of Rac is electrostatic and nonspecific (Fig. 2A). This leaves the choice of the lipid composition quite open for studying the influence of the lipid membrane environment (Mesmin *et al.*, 2004). If one lipid species is suspected to play a role in the interaction of Rac with a given target, one has to take into account its contribution to the percentage of anionic lipids,

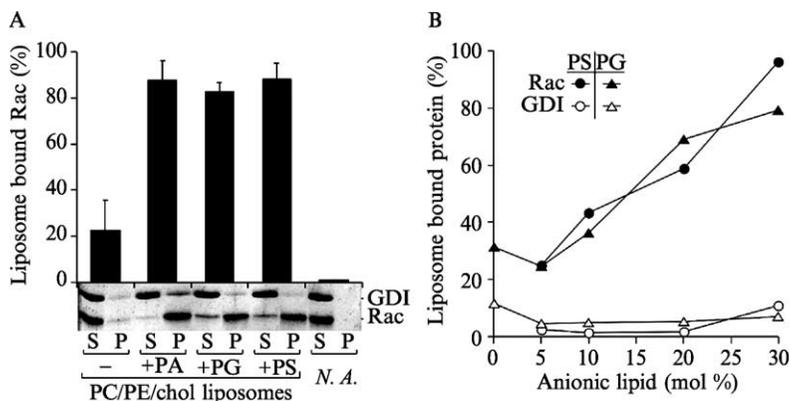


FIG. 2. Effect of anionic lipids on the partitioning of Rac between GDI and liposomes. (A) The Rac-GDP/GDI complex ($1 \mu M$) is incubated for 40 min at 30° with GTP ($20 \mu M$) and with or without PC/PE/cholesterol liposomes (30–60/20/20 mol%) and supplemented with 30 mol% PA, PG, or PS as indicated. The concentration of free Mg^{2+} is $1 \mu M$. After incubation, the sample is centrifuged, and the supernatant (S) and the pellet (P) are analyzed by SDS-PAGE and Sypro Orange staining. N. A., No addition of liposomes. (B) Dose-response experiments using liposomes containing increasing amounts of anionic lipids (PS or PG) at expense of PC. (A) from Mesmin *et al.* (2004).

so as to keep this percentage constant. A neutral lipid should be added at the expense of PC, whereas an anionic lipid should be added at the expense of PS (or PG).

Rac accumulates on the inner leaflet of the plasma membrane. Ideally, the background composition of the liposome should imitate this leaflet, notably the abundance of PS and phosphatidylethanolamine (PE). Our standard liposome composition consists of egg PC (30 mol%), liver PE (20 mol%), brain PS (30 mol%), and cholesterol (20 mol%). This composition can be considered as a reasonable starting mixture, which can be modified according to the molecular mechanism studied. Of note, lipid chain unsaturation has strong impact on the adsorption of some proteins, because it modulates the penetration of hydrophobic residues. Experiments in which dioleoyl lipids (C18:1–C18:1) are substituted for lipids from natural sources can be informative.

Guanine Nucleotide Exchange on Liposome-Bound Rac

GEFs for Rho proteins contain a catalytic module, the DH-PH tandem, which promotes the release of GDP (Schmidt and Hall, 2002). This tandem is quite inefficient in catalyzing nucleotide exchange in solution, and it is believed that the membrane environment could favor better positioning of the DH-PH tandem toward membrane-associated Rho proteins (Baumeister *et al.*, 2003). This hypothesis is supported by the observation that the DH-PH tandem of the exchange factor Tiam1 catalyses GDP to GTP exchange on geranyl-geranylated Rac bound to azolectin liposomes much more efficiently than on nonprenylated Rac in solution (Robbe *et al.*, 2003).

Liposome-bound Rac-GDP, which is obtained by the GDI removal protocol, is diluted twofold in buffer A supplemented with 20 μM [^{35}S]GTP γS (2000 cpm/pmol) to give a final lipid concentration of 3 mM and a final protein concentration of $\sim 0.25 \mu\text{M}$ (as estimated by SDS-PAGE). The sample is incubated at 30° and at time zero, Tiam DH-PH (0–4 μM) is added. At the indicated times, 20- μl aliquots are removed and immediately diluted into 2 ml of ice-cold buffer (buffer C; 20 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, and 10 mM MgCl_2), and filtered on nitrocellulose filter disks (Schleicher & Schüll) mounted on a holder (Millipore, ref XX1002530) connected to a vacuum pump. The filter-disk is washed twice with 2 ml of buffer C, dried, and counted. The same protocol is used to measure the binding of [^{35}S]GTP γS on unprenylated-Rac in solution. Figure 3A compares the time courses of [^{35}S]GTP γS binding on prenylated Rac bound to azolectin liposomes and on soluble nonprenylated Rac catalyzed by 0.08 μM Tiam1 DH-PH. A control experiment performed in the absence of DH-PH shows that the spontaneous rate of nucleotide exchange on Rac

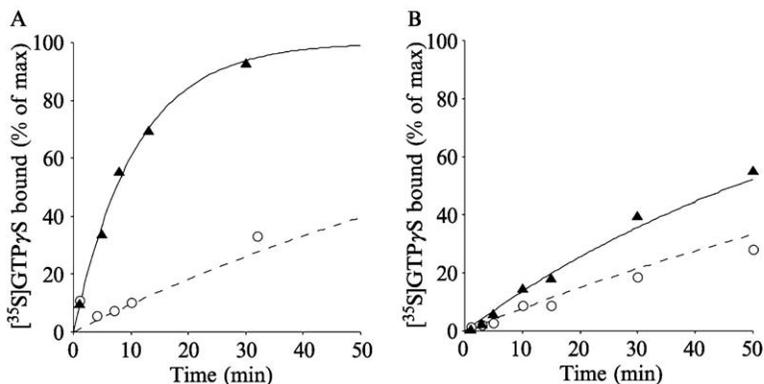


FIG. 3. Nucleotide exchange assays. Comparison between geranyl-geranylated Rac-GDP associated with azolectin liposomes (A) and unprenylated Rac-GDP in solution (B) for Tiam 1 DH-PH-catalyzed GDP-to-GTP γ S exchange. All experiments are performed at 1 mM free Mg²⁺ with 20 μ M [³⁵S]GTP γ S with or without 0.08 μ M Tiam1 DH-PH. Adapted from Robbe *et al.* (2003).

is not influenced by the membrane environment. In marked contrast the DH-PH-catalyzed reaction is accelerated 10-fold at the liposome surface.

Glucosylation of Liposome-Bound Rac

Large clostridial toxins such as lethal toxin (LT) are glucosyltransferases, which catalyze the transfer of a glucosyl group from UDP-glucose to a conserved threonine residue within the switch I region of small G proteins (Busch and Aktories, 2000). With the help of the GDI-removal protocol, we have recently shown that LTcyt, the fragment that is liberated in the cytosol of infected cells, takes advantage of the lipid membrane environment to glucosylate efficiently membrane-bound prenylated Rac (Mesmin *et al.*, 2004). Indeed, LTcyt binds specifically to PS. Two protocols are detailed here: one to assess the binding of LTcyt to liposomes and a second to follow the glucosylation of liposome-bound Rac.

The binding of LT to liposome is determined by sedimentation experiments using the protocol developed by McLaughlin (Buser and McLaughlin, 1998). LT, Lt_{cyt}, or other purified toxin fragments are mixed in buffer B with sucrose-loaded liposomes of defined composition obtained by extrusion through 0.4- μ m polycarbonate filters. The protein concentration should be in the micromolar range, and the lipid concentration in the millimolar range. The mixture (50 μ l) is prepared directly in small polycarbonate centrifuge tubes and centrifuged at 100,000 rpm (400,000g)

in a TL100.1 centrifuge (Beckman) for 20 min at 4°. One control experiment should be performed in the absence of liposome. The supernatant and the pellet, which is resuspended in the same volume of buffer, are analyzed by SDS-PAGE. The protein gels are stained with the fluorescent dye sypro-orange, digitalized, and quantified using the fluorescent imaging system (FUJI LAS 3000).

If the sedimentation assay with sucrose-loaded liposomes is straightforward, it should be noted that it is not adapted to the study of large protein complexes (which tend to pellet in the absence of liposomes) or when very small liposomes are used to study the effect of membrane curvature. In these cases, it is preferable to collect the liposomes and bound proteins by flotation on dense sucrose cushions (see Bigay and Antonny, chapter 10, *Methods in Enzymology*, vol. 404).

The radioactive assay used to follow Rac glucosylation by LT is very similar to the guanine nucleotide exchange assay described previously. Liposome-bound Rac-GDP is diluted twofold in buffer B supplemented with 1 mM MnCl₂ and 10 μM [¹⁴C]UDP-glucose (732.6 dpm/pmol) to give a final lipid concentration of 3 mM and a final protein concentration of ~0.25 μM (as estimated by SDS-PAGE). The glucosylation reaction is performed

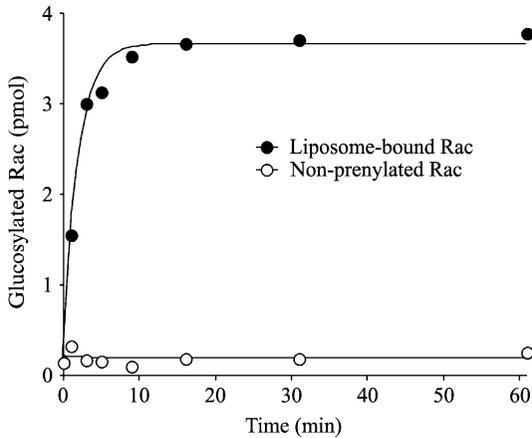


FIG. 4. Glucosylation experiments. Comparison between geranyl-geranylated Rac-GDP bound to PC/PE/cholesterol liposomes supplemented with 30 mol% PS (filled circles), or unprenylated Rac-GDP in solution (open circles) for LT_{cyt}-catalyzed glucosylation. Glucosylation is initiated by the addition of 0.25 nM of toxin on membrane bound prenylated Rac-GDP (~0.25 μM) or on unprenylated Rac-GDP (0.5 μM) in the presence of [¹⁴C]-UDP-glucose (10 μM). Protein-bound radioactivity was determined on 20-μl aliquots (~5 pmol of Rac per aliquot). Continuous traces represent best single exponential fits. Adapted from Mesmin *et al.* (2004).

at 30° and is initiated by the addition of the LT or other LT fragments. At the indicated times, 20- μ l aliquots are withdrawn, diluted in 2 ml of ice-cold buffer D (20 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM KCl, and 10 mM MgCl₂), and filtered on 25-mm BA85 nitrocellulose filters (Schleicher & Schüll) mounted on a holder connected to a vacuum pump. After two additional washes with 2 ml of buffer D, the filters are dried and counted. The same protocol is used to measure the unprenylated Rac glucosylation in solution.

Figure 4 compares the time courses of glucosylation of liposome-bound geranyl-geranylated Rac-GDP and of unprenylated Rac with 0.25 nM LTcyt. At the concentration of LTcyt used here, the glucosylation of soluble unprenylated Rac is not detectable, whereas liposome-bound prenylated Rac is glucosylated within minutes. The liposomes used in these experiments contain 30% PC, 20% PE, 30% PS, and 20% cholesterol. Fast glucosylation occurs because LTcyt binds to PS.

In conclusion, the GDI-removal protocol is a straightforward method to obtain pure prenylated Rac in any conformation (GDP or GTP) and bound to liposomes that can imitate the cell environment. In contrast, experiments in which lipids and notably phosphoinositides are simply added in solution as emulsions obtained by sonication lead to conflicting results, because phosphoinositides are so highly charged that they can promote nonspecific effects (Chabre *et al.*, 1998). The protocol described here should be useful for studying various molecular events controlled by Rac in a minimal and controlled lipid environment.

References

- Baumeister, M. A., Martinu, L., Rossman, K. L., Sondek, J., Lemmon, M. A., and Chou, M. M. (2003). Loss of phosphatidylinositol 3-phosphate binding by the C-terminal Tiam-1 pleckstrin homology domain prevents *in vivo* Rac1 activation without affecting membrane targeting. *J. Biol. Chem.* **278**, 11457–11464.
- Buser, C. A., and McLaughlin, S. (1998). Ultracentrifugation technique for measuring the binding of peptides and proteins to sucrose-loaded phospholipid vesicles. *Methods Mol. Biol.* **84**, 267–281.
- Busch, C., and Aktories, K. (2000). Microbial toxins and the glycosylation of rho family GTPases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 528–535.
- Chabre, M., Antony, B., and Paris, S. (1998). PIP2: Activator ... or terminator of small G proteins? *Trends Biochem. Sci.* **23**, 98–100.
- Duzgunes, N. (2003). Preparation and quantitation of small unilamellar liposomes and large unilamellar reverse-phase evaporation liposomes. *Methods Enzymol.* **367**, 23–27.
- Hoffman, G. R., Nassar, N., and Cerione, R. A. (2000). Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI.PG-345–56. *Cell* **100**, 345–356.
- MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P., Takeshita, K., Subbarao, N. K., and Hu, L. R. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1061**, 297–303.

- Mayer, L. D., Hope, M. J., and Cullis, P. R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim. Biophys. Acta* **858**, 161–168.
- Mesmin, B., Robbe, K., Geny, B., Luton, F., Brandolin, G., Popoff, M. R., and Antonny, B. (2004). A phosphatidylserine-binding site in the cytosolic fragment of *Clostridium sordellii* lethal toxin facilitates glucosylation of membrane-bound Rac and is required for cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**, 49876–49882.
- Mui, B., Chow, L., and Hope, M. J. (2003). Extrusion technique to generate liposomes of defined size. *Methods Enzymol.* **367**, 3–14.
- Read, P. W., Liu, X., Longenecker, K., Dipierro, C. G., Walker, L. A., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P., and Nakamoto, R. K. (2000). Human RhoA/RhoGDI complex expressed in yeast: GTP exchange is sufficient for translocation of RhoA to liposomes. *Protein Sci.* **9**, 376–386.
- Read, P. W., and Nakamoto, R. K. (2000). Expression and purification of Rho/RhoGDI complexes. *Methods Enzymol.* **325**, 15–25.
- Robbe, K., and Antonny, B. (2003). Liposomes in the study of GDP/GTP cycle of Arf and related small G proteins. *Methods Enzymol.* **372**, 151–166.
- Robbe, K., Otto-Bruc, A., Chardin, P., and Antonny, B. (2003). Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J. Biol. Chem.* **278**, 4756–4762. Epub 2002 Dec 5.
- Sasaki, T., Kato, M., and Takai, Y. (1993). Consequences of weak interaction of rho GDI with the GTP-bound forms of rho p21 and rac p21. *J. Biol. Chem.* **268**, 23959–23963.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: Turning on the switch. *Genes Dev.* **16**, 1587–1609.
- Silvius, J. R., and l'Heureux, F. (1994). Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers. PG-3014–22. *Biochemistry* **33**, 3014–3022.
- Szoka, F., Jr., and Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4194–4198.
- Weast, R. C. (1989). *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton, FL.

[7] Phosphorylation of RhoGDI by p21-Activated Kinase 1

By CELINE M. DERMARDIROSIAN and GARY M. BOKOCH

Abstract

Rho GTPase activation is partially regulated at the level of guanine nucleotide dissociation inhibitors, or GDIs. The binding of Rho GTPases to GDIs has been shown to dramatically reduce the action of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) to initiate Rho GTPase activation. The GDI–GTPase complex thus serves as a major point of regulation of Rho GTPase activity and function. It is likely that specific mechanisms exist to dissociate individual members of the Rho GTPase family from

ARTICLE ANNEXE 3 :

Membrane curvature and the control of GTP hydrolysis in Arf1 during COPI vesicle formation

Bruno Antonny, Joëlle Bigay, Jean-François Casella, Guillaume Drin, Bruno Mesmin, Pierre Gounon

Membrane curvature and the control of GTP hydrolysis in Arf1 during COPI vesicle formation

B. Antony¹, J. Bigay, J.-F. Casella, G. Drin, B. Mesmin and P. Gounon

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS et Université de Nice, 660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne Sophia-Antipolis, France

Abstract

The GTP switch of the small G-protein Arf1 (ADP-ribosylation factor 1) on lipid membranes promotes the polymerization of the COPI (coat protein complex I) coat, which acts as a membrane deforming shell to form transport vesicles. Real-time measurements for coat assembly on liposomes gives insights into how the GTPase cycle of Arf1 is coupled in time with the polymerization of the COPI coat and the resulting membrane deformation. One key parameter seems to be the membrane curvature. Arf-GAP1 (where GAP stands for GTPase-activating protein), which promotes GTP hydrolysis in the Arf1-COPI complex is highly sensitive to lipid packing. Its activity on Arf1-GTP increases by two orders of magnitude as the diameter of the liposomes approaches that of authentic transport vesicles (60 nm). This suggests that during membrane budding, Arf1-GTP molecules are progressively eliminated from the coated area where the membrane curvature is positive, but are protected from Arf-GAP1 at the bud neck due to the negative curvature of this region. As a result, the coat should be stable as long as the bud remains attached and should disassemble as soon as membrane fission occurs.

Introduction

Figure 1(A) shows the classical GTPase cycle of a G-protein as seen in many textbooks. The G-protein undergoes a binary switch between a GDP conformation and a GTP conformation through the catalytic activities of a GEF (guanine nucleotide-exchange factor) and a GAP (GTPase-activating protein). When bound to GTP, the G-protein interacts with an effector target. The consequence of this GTP-dependent interaction ranges from change in enzymatic activity to change in ionic conductance or change in localization depending on the nature of the effector target. However, regardless of the exact nature of the effector, the molecular response follows the binary switch of the G-protein because it is based on the formation of a simple 1:1 complex. In other words, the output is in phase with the input. Yet there are mechanisms for which the relationship between the binary switch of a G-protein and the molecular response is less trivial.

Protein coats are large polymeric structures that assemble at the cytoplasmic surface of cell membranes, from which they promote the budding of small (<100 nm in diameter) transport vesicles. For the COPI (coat protein complex I) and COPII coats, which drive the formation of transport vesicles between the endoplasmic reticulum and the Golgi, it has been clearly established that their assembly is controlled by small G-proteins from the Arf (ADP-ribosylation factor) family (Arf1 in the case of COPI and Sar1 in the case of COPII) [1,2]. When Arf switches to the GTP conformation, it becomes firmly anchored to the membrane surface through

the exposure of its N-terminal amphipathic helix. Arf-GTP promotes the membrane recruitment of large COP complexes, which can collect the cytosolic tails of transmembrane proteins and self-assemble to form a polymeric two-dimensional structure. This structure has an intrinsic curvature and thereby promotes the formation of a coated vesicle by a budding/fission process.

Coat assembly and membrane budding can be observed when Arf is permanently activated by non-hydrolysable analogues of GTP (such as GTP[S]). Conversely, coat disassembly requires GTP hydrolysis in Arf1. Therefore it is tempting to conclude that the assembly–disassembly cycle of the coat is in phase with the GDP/GTP cycle of Arf. But this is probably an over-simplification. Compare the two coat-building units shown in Figure 1(B). The first is a recently formed 1:1 complex between Arf-GTP and a COP complex wandering at the membrane surface by lateral diffusion. The second is an older unit, which has been incorporated in the coat lattice. If GTP hydrolysis occurs in the ‘young’ unit, both Arf-GDP and the COP complex will obviously dissociate from the membrane. This is a futile cycle, as the coat has not performed its function yet. Now what happens if GTP hydrolysis occurs in the ‘old’ coat unit? Here, the answer depends on the lateral interactions between the polymerized COP units. If these lateral interactions are strong enough, they should keep the COP unit assembled in the lattice despite the loss of Arf. So one key question in protein coat dynamics is the temporal and spatial control of the GTP hydrolysis reaction as the coat lattice starts to grow and to curve the lipid membrane [3]. Here, we will depict two mechanisms that give such a temporal and spatial control of GTP hydrolysis: (i) coat polymerization and (ii) membrane curvature.

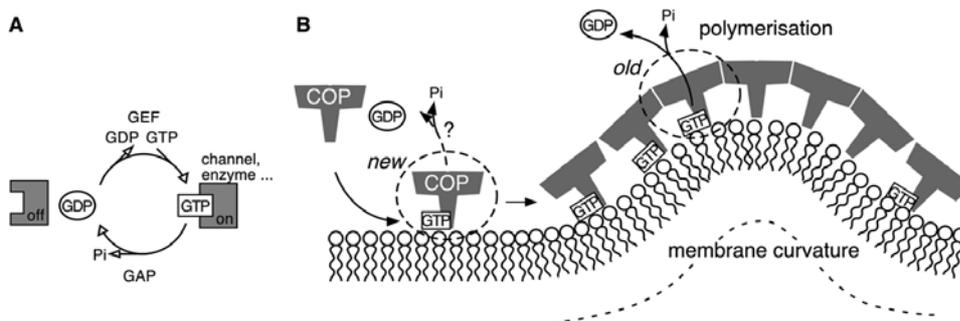
Key words: Arf1, coat protein complex, G-protein, GDP, GTP, liposome.

Abbreviations used: Arf, ADP-ribosylation factor; BAR, bin, amphiphysin and Rvs; COP, coat protein complex; 1,2-DOG, dioleoylglycerol; GAP, GTPase-activating protein; GEF, guanine nucleotide-exchange factor.

¹To whom correspondence should be addressed (email antony@ipmc.cnrs.fr).

Figure 1 | GTP hydrolysis and COP dynamics: a complex issue

(A) Classical view of a G-protein cycle. The G-protein effector follows exactly the molecular switch of the G-protein. (B) In protein coats, as in other polymers, the assembly–disassembly cycle is not necessarily in phase with the GTPase cycle because the probability for a COP unit to disassemble when the small G-protein hydrolyses its GTP depends on the location of the COP unit in the lattice.

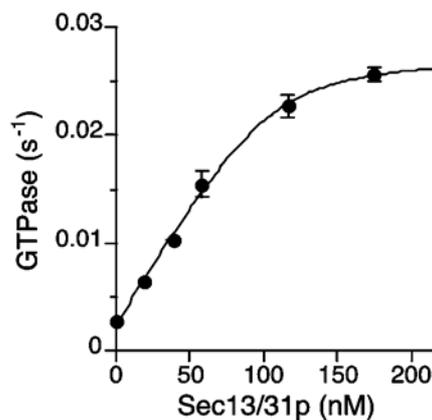
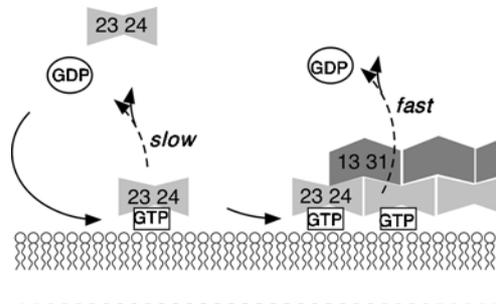
**Control of GTP hydrolysis by COP polymerization**

Sar1 is a ‘cousin’ of Arf1 and controls the assembly of the protein coat COPII. This coat consists of three protein ‘layers’: Sar-GTP and two large complexes Sec23/Sec24 and Sec13/Sec31. These proteins assemble in a stepwise manner at the surface of the endoplasmic reticulum membrane [4]. First, Sar1 translocates to the lipid bilayer in a GTP-dependent manner. Then Sec23/Sec24 interacts with Sar-GTP. Lastly Sec13/Sec31 polymerizes the Sar1-GTP–Sec23/Sec24 complex in a coat structure. One puzzling characteristic of the COPII coat is that Sec23/Sec24 is a GAP for Sar1. Sec23/Sec24 has thus two seemingly opposite faces: it is a structural component of the coat but on the other hand its GAP activity may counteract COPII complete assembly.

We have devised real-time assays to follow COP coat dynamics [5]. One is based on a large tryptophan fluorescence change that accompanies the GDP/GTP switch of Arf or Sar. By measuring the level of tryptophan fluorescence in a solution of Arf/Sar with liposomes, one can easily follow Arf activation by GEFs or Arf inactivation through GTP hydrolysis by GAP. The second assay is based on the scattering of light. When the various layers of the coat cover liposomes, a light scattering increase is observed due to the increase in the refractive index of the membrane. One can thus follow a cycle of COP assembly and disassembly on liposomes.

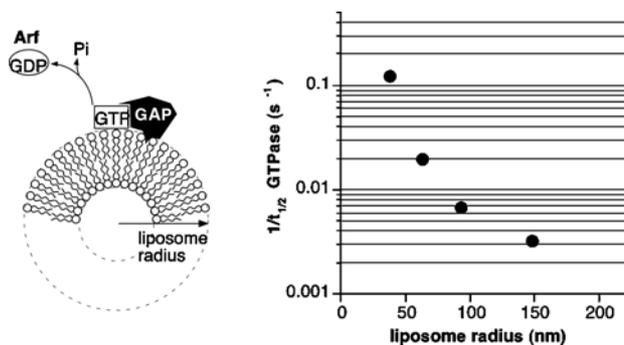
With these two assays, we have observed that the GAP activity of Sec23/Sec24 is regulated by COPII polymerization [5]. GTP hydrolysis in an isolated Sar1-GTP–Sec23/Sec24 complex is slow (half-time = 1 min). In contrast, when such a complex is polymerized through the action of Sec13/Sec31, the rate of GTP hydrolysis is accelerated 10-fold (Figure 2). With such a two-gear mechanism, new Sar-GTP–Sec23/Sec24 complexes would have the time to diffuse and collect cargo molecules before GTP hydrolysis. GTP hydrolysis would occur only after incorporation of the complex in the polymerized coat by Sec13/Sec31. Therefore the probability

Figure 2 | Effect of the Sec13/Sec31p complex on the GAP activity of Sec23/Sec24 on Sar1p-GTP bound to liposomes [adapted from [5] with permission © Nature Publishing Group (<http://www.nature.com/>)].



of having Sar1-GTP in the lattice should decrease from the periphery to the centre of the coat, since the lateral distribution of the COP complexes reflects their sequence of assembly. At the molecular level, the mechanism by which Sec13/Sec31 accelerates the GAP activity of Sec23/Sec24 is not known.

Figure 3 | Effect of liposome radius on the rate of GTP hydrolysis on Arf1 catalysed by Arf-GAP1 [adapted from [8] with permission © Nature Publishing Group (<http://www.nature.com/>)].



Control of GTP hydrolysis by COP-induced membrane curvature

Whereas the GAP for Sar1 is a structural element of the COPII coat, the GAP for Arf1 in the COPI coat is an accessory protein, which is not required for COPI polymerization [6]. Arf-GAP1 displays puzzling properties regarding its interaction with the lipid bilayer [7]. Incorporating a few mol% of 1,2-DOG (dioleoylglycerol), a diacyl glycerol with two mono-unsaturated C18:1 acyl chains, promotes the recruitment Arf-GAP1 to liposomes and facilitates its action on liposome-bound Arf-GTP. Surprisingly, the effect of 1,2-DOG does not depend on the position of the ester bonds that connect the acyl chains to the glycerol group but was reduced when the oleoyl chains were replaced by saturated acyl chains. These observations rule out a PKC (protein kinase C)-like model, in which Arf-GAP1 would recognize specifically the diacyl glycerol molecule. So what explains the DOG effect? Compared with classical lipid species, DOG has conical shape due to the lack of polar head and the presence of a kink right in the middle of the acyl chains. As a result, DOG does not pack well against more cylindrical lipids. We postulated that Arf-GAP1 senses these packing defects by intercalating bulky hydrophobic residues [7]. Whether the effect of DOG is physiologically relevant is unknown, however the physical basis for the DOG effect leads to an intriguing hypothesis.

When a membrane is curved through the mechanical stress imposed by a protein coat, lipid packing in the inner (luminal) leaflet must increase, whereas lipid packing in the outer leaflet (cytosolic) must decrease. On a short-time scale (minutes), lipid flip-flop cannot compensate for this stress as it takes hours for most lipids to translocate between two lipid leaflets. We therefore postulated that Arf-GAP1 could sense these lipid-packing changes and act more readily on Arf-GTP as the membrane becomes curved [8]. As shown in Figure 3, the rate of GTP hydrolysis on Arf1 initiated by the addition of Arf-GAP1 indeed increases with the curvature of the liposomes. Reducing the liposome radius from 150 to 35 nm (the approximate size of a transport vesicle) increases the rate 30-fold. Other experiments suggest that the remarkable

sensitivity of Arf-GAP1 to liposome radius also applies when Arf-GTP is engaged in the COPI coat [8].

If we now extrapolate these results to a COPI-coated bud, Arf-GAP1 should eliminate most Arf1 molecules from the coat except at the edge of the coat where membrane curvature is negative. This is exactly what you need to maintain a polymer in a metastable state: remove some links when they become dispensable in the centre, but protect the edges, where the lateral interactions are not complete.

How does Arf-GAP1 recognize membrane curvature?

There are probably not very many ways to recognize a curved membrane. One is to recognize the curvature itself, and this is exactly what BAR (bin, amphiphysin and Rvs) domains do [9]. These domains have a banana shape with a concave basic face, ideally adapted to interact with highly curved and negatively charged membranes. Depending on the strength of the BAR–membrane interaction, a BAR domain can either sense or induce membrane curvature. The structure of the BAR domain is a dimer made by a coiled-coil of six helices, three from each monomer.

Except for the presence of an N-terminal 120 amino acid zinc-finger module, which is responsible for its GAP activity, Arf-GAP1 bears no structurally identified domain. Notably, the lack of predicted coiled-coil regions strongly suggests that Arf-GAP1 contains no BAR domain. However, this is nothing but surprising. Indeed and as mentioned above, Arf-GAP1 is not sensitive to membrane curvature by itself, but to the lipid packing defects induced by membrane curvature, and sensing lipid-packing changes should require a deeper protein–membrane interaction as compared with sensing the geometric curvature of the lipid bilayer.

To identify the putative lipid-packing sensing region in Arf-GAP1, we have taken advantage of the homology between Arf-GAP1 and Gcs1p. Gcs1p is the closest homologue of Arf-GAP1 in yeast. In contrast with other Arf-GAPs, the homology between Gcs1p and Arf-GAP1 extends outward from the N-terminal zinc-finger GAP domain as it includes a small central region of approx. 50 amino acids. We observed that Gcs1p is highly sensitive to membrane curvature, and therefore suspected that the small central homology region could be involved. Current studies suggest that this region indeed senses lipid packing through the intercalation of hydrophobic residues within loosely packed lipids [10].

Concluding remark

The dynamics of protein coat is a challenging issue because, as for other polymers, there is no linear correlation between the behaviour of each unit (e.g. GDP or GTP) and the behaviour of the polymer (assembled or disassembled) [11]. One key parameter is the position of a COP unit within the lattice. The experiments presented here suggest two mechanisms that permit the control of COP units according to their position (central or peripheral) in the lattice.

B.A. is supported by the EMBO Young Investigator Program. This work was supported by the CNRS through ACI 'Jeunes chercheurs' and ACI 'Dynamique et réactivité des assemblages biologiques'.

References

- 1 Rothman, J.E. and Wieland, F.T. (1996) *Science* **272**, 227–234
- 2 Schekman, R. and Orci, L. (1996) *Science* **271**, 1526–1533
- 3 Antonny, B. and Schekman, R. (2001) *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 438–443
- 4 Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R. (1994) *Cell (Cambridge, Mass.)* **77**, 895–907
- 5 Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 531–537
- 6 Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M. and Cassel, D. (1995) *Science* **270**, 1999–2002
- 7 Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M. and Cassel, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30848–30851
- 8 Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S. and Antonny, B. (2003) *Nature (London)* **426**, 563–566
- 9 Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R. and McMahon, H.T. (2004) *Science* **303**, 495–499
- 10 Bigay, J., Corella, J.F., Drin, G., Mesmin, B. and Antonny, B. (2005) *EMBO J.*, in the press
- 11 Desai, A. and Mitchison, T.J. (1997) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 83–117

Received 22 February 2005

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A. and Ringe, D. (1994) Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature*, **372**, 704-708.
- Antonny, B. (1999) La protéine G ARF: interaction avec la membrane, la protéine GAP et le facteur d'échange ARNO. *Habilitation à diriger des recherches*. Université de Nice Sophia-Antipolis.
- Antonny, B. (2002) Contrôle de l'assemblage des manteaux protéiques COP par les petites protéines G Arf et Sar. *Médecine Sciences*, **18**, 1012-1016.
- Antonny, B. (2006) Membrane deformation by protein coats. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 386-394.
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. and Chabre, M. (1997a) N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*, **36**, 4675-4684.
- Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M. and Cassel, D. (1997b) Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem*, **272**, 30848-30851.
- Aoe, T., Cukierman, E., Lee, A., Cassel, D., Peters, P.J. and Hsu, V.W. (1997) The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *Embo J*, **16**, 7305-7316.
- Aoe, T., Huber, I., Vasudevan, C., Watkins, S.C., Romero, G., Cassel, D. and Hsu, V.W. (1999) The KDEL receptor regulates a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor 1 by interacting with its non-catalytic domain. *J Biol Chem*, **274**, 20545-20549.
- Balch, W.E., Dunphy, W.G., Braell, W.A. and Rothman, J.E. (1984) Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell*, **39**, 405-416.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R. (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, **77**, 895-907.
- Beams, H.W. and Kessel, R.G. (1968) The Golgi apparatus: structure and function. *Int Rev Cytol*, **23**, 209-276.
- Behnia, R. and Munro, S. (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, **438**, 597-604.
- Beraud-Dufour, S., Paris, S., Chabre, M. and Antonny, B. (1999) Dual interaction of ADP ribosylation factor 1 with Sec7 domain and with lipid membranes during catalysis of guanine nucleotide exchange. *J Biol Chem*, **274**, 37629-37636.

- Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Chardin, P., Paris, S., Chabre, M., Cherfils, J. and Antonny, B. (1998) A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. *Embo J*, **17**, 3651-3659.
- Bernstein, L.S., Grillo, A.A., Loranger, S.S. and Linder, M.E. (2000) RGS4 binds to membranes through an amphipathic alpha -helix. *J Biol Chem*, **275**, 18520-18526.
- Bigay, J., Casella, J.F., Drin, G., Mesmin, B. and Antonny, B. (2005) ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *Embo J*, **24**, 2244-2253.
- Bigay, J., Deterre, P., Pfister, C. and Chabre, M. (1985) Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the gamma-phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Lett*, **191**, 181-185.
- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S. and Antonny, B. (2003) Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature*, **426**, 563-566.
- Bonfanti, L., Mironov, A.A., Jr., Martinez-Menarguez, J.A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H.J., Mironov, A.A. and Luini, A. (1998) Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell*, **95**, 993-1003.
- Boumann, H.A., Gubbens, J., Koorengel, M.C., Oh, C.S., Martin, C.E., Heck, A.J., Patton-Vogt, J., Henry, S.A., de Kruijff, B. and de Kroon, A.I. (2006) Depletion of phosphatidylcholine in yeast induces shortening and increased saturation of the lipid acyl chains: evidence for regulation of intrinsic membrane curvature in a eukaryote. *Mol Biol Cell*, **17**, 1006-1017.
- Bourne, H.R. (1988) Do GTPases direct membrane traffic in secretion? *Cell*, **53**, 669-671.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, **348**, 125-132.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. and McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-127.
- Bremser, M., Nickel, W., Schweikert, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Hughes, C.A., Sollner, T.H., Rothman, J.E. and Wieland, F.T. (1999) Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell*, **96**, 495-506.
- Bretscher, M.S. (1973) Membrane structure: some general principles. *Science*, **181**, 622-629.
- Busch, C. and Aktories, K. (2000) Microbial toxins and the glycosylation of rho family GTPases. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 528-535.

- Busch, C., Hofmann, F., Selzer, J., Munro, S., Jeckel, D. and Aktories, K. (1998) A common motif of eukaryotic glycosyltransferases is essential for the enzyme activity of large clostridial cytotoxins. *J Biol Chem*, **273**, 19566-19572.
- Buser, C.A., Sigal, C.T., Resh, M.D. and McLaughlin, S. (1994) Membrane binding of myristylated peptides corresponding to the NH2 terminus of Src. *Biochemistry*, **33**, 13093-13101.
- Cabin, D.E., Shimazu, K., Murphy, D., Cole, N.B., Gottschalk, W., McIlwain, K.L., Orrison, B., Chen, A., Ellis, C.E., Paylor, R., Lu, B. and Nussbaum, R.L. (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci*, **22**, 8797-8807.
- Casanova, J.E. (2007) Regulation of arf activation: the sec7 family of Guanine nucleotide exchange factors. *Traffic*, **8**, 1476-1485.
- Casey, P.J. and Seabra, M.C. (1996) Protein prenyltransferases. *J Biol Chem*, **271**, 5289-5292.
- Cassel, D. and Pfeuffer, T. (1978) Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 2669-2673.
- Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C.L. and Chabre, M. (1996) A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, **384**, 481-484.
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. and Zerial, M. (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*, **62**, 317-329.
- Chelsky, D., Ruskin, B. and Koshland, D.E., Jr. (1985) Methyl-esterified proteins in a mammalian cell line. *Biochemistry*, **24**, 6651-6658.
- Cheng, Y., Boll, W., Kirchhausen, T., Harrison, S.C. and Walz, T. (2007) Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly. *J Mol Biol*, **365**, 892-899.
- Cherfils, J., Menetrey, J., Mathieu, M., Le Bras, G., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Antonny, B. and Chardin, P. (1998) Structure of the Sec7 domain of the Arf exchange factor ARNO. *Nature*, **392**, 101-105.
- Claude, A., Zhao, B.P., Kuziemy, C.E., Dahan, S., Berger, S.J., Yan, J.P., Arnold, A.D., Sullivan, E.M. and Melancon, P. (1999) GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *J Cell Biol*, **146**, 71-84.
- Cockcroft, S., Thomas, G.M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N.F., Truong, O. and Hsuan, J.J. (1994) Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science*, **263**, 523-526.

- Cohen, L.A., Honda, A., Varnai, P., Brown, F.D., Balla, T. and Donaldson, J.G. (2007) Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell*, **18**, 2244-2253.
- Cornell, R.B. (1991) Regulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by lipids. 2. Surface curvature, acyl chain length, and lipid-phase dependence for activation. *Biochemistry*, **30**, 5881-5888.
- Cornell, R.B. and Taneva, S.G. (2006) Amphipathic helices as mediators of the membrane interaction of amphitropic proteins, and as modulators of bilayer physical properties. *Curr Protein Pept Sci*, **7**, 539-552.
- Cosson, P., Demolliere, C., Hennecke, S., Duden, R. and Letourneur, F. (1996) Delta- and zeta-COP, two coatomer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval. *Embo J*, **15**, 1792-1798.
- Cosson, P. and Letourneur, F. (1994) Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*, **263**, 1629-1631.
- Csukai, M., Chen, C.H., De Matteis, M.A. and Mochly-Rosen, D. (1997) The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon. *J Biol Chem*, **272**, 29200-29206.
- Cukierman, E., Huber, I., Rotman, M. and Cassel, D. (1995) The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science*, **270**, 1999-2002.
- D'Angelo, G., Polishchuk, E., Tullio, G.D., Santoro, M., Campli, A.D., Godi, A., West, G., Bielawski, J., Chuang, C.C., van der Spoel, A.C., Platt, F.M., Hannun, Y.A., Polishchuk, R., Mattjus, P. and De Matteis, M.A. (2007) Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature*.
- D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P. (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 347-358.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I. and Stahl, P.D. (1995) A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science*, **267**, 1175-1178.
- Dathe, M. and Wieprecht, T. (1999) Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta*, **1462**, 71-87.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F. and George, J.M. (1998) Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*, **273**, 9443-9449.
- Davies, S.M., Epand, R.M., Kraayenhof, R. and Cornell, R.B. (2001) Regulation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase activity by the physical properties of lipid membranes: an important role for stored curvature strain energy. *Biochemistry*, **40**, 10522-10531.

- Devos, D., Dokudovskaya, S., Alber, F., Williams, R., Chait, B.T., Sali, A. and Rout, M.P. (2004) Components of coated vesicles and nuclear pore complexes share a common molecular architecture. *PLoS Biol*, **2**, e380.
- Di Paolo, G. and De Camilli, P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, **443**, 651-657.
- DiNitto, J.P., Cronin, T.C. and Lambright, D.G. (2003) Membrane recognition and targeting by lipid-binding domains. *Sci STKE*, **2003**, re16.
- Dogic, D., de Chasse, B., Pick, E., Cassel, D., Lefkir, Y., Hennecke, S., Cosson, P. and Letourneur, F. (1999) The ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Glo3p is involved in ER retrieval. *Eur J Cell Biol*, **78**, 305-310.
- Donaldson, J.G., Cassel, D., Kahn, R.A. and Klausner, R.D. (1992) ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatmer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6408-6412.
- Donaldson, J.G., Honda, A. and Weigert, R. (2005) Multiple activities for Arf1 at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta*, **1744**, 364-373.
- Dransart, E., Olofsson, B. and Cherfils, J. (2005) RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic*, **6**, 957-966.
- Drin, G., Casella, J.F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T.U. and Antonny, B. (2007) A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 138-146.
- Dubois, T., Paleotti, O., Mironov, A.A., Fraissier, V., Stradal, T.E., De Matteis, M.A., Franco, M. and Chavrier, P. (2005) Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics. *Nat Cell Biol*, **7**, 353-364.
- Duden, R., Griffiths, G., Frank, R., Argos, P. and Kreis, T.E. (1991) Beta-COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to beta-adaptin. *Cell*, **64**, 649-665.
- Dumas, J.J., Merithew, E., Sudharshan, E., Rajamani, D., Hayes, S., Lawe, D., Corvera, S. and Lambright, D.G. (2001) Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol Cell*, **8**, 947-958.
- Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2002) Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 54-60.
- Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M.L. and Kirchhausen, T. (2004) Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell*, **118**, 591-605.
- Engelman, D.M. (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, **438**, 578-580.

- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. and Duden, R. (2000) COP I domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *Embo J*, **19**, 3905-3917.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. and Duden, R. (2004) The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol Cell*, **15**, 1011-1023.
- Farquhar, M.G. and Palade, G.E. (1981) The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage. *J Cell Biol*, **91**, 77s-103s.
- Farquhar, M.G. and Palade, G.E. (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol*, **8**, 2-10.
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S.R., Rose, K. and De Camilli, P. (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol*, **155**, 193-200.
- Fath, S., Mancias, J.D., Bi, X. and Goldberg, J. (2007) Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell*, **129**, 1325-1336.
- Fernandez-Ulibarri, I., Vilella, M., Lazaro-Dieguez, F., Sarri, E., Martinez, S.E., Jimenez, N., Claro, E., Merida, I., Burger, K.N. and Egea, G. (2007) Diacylglycerol Is Required for the Formation of COPI Vesicles in the Golgi-to-ER Transport Pathway. *Mol Biol Cell*, **18**, 3250-3263.
- Fiedler, K., Veit, M., Stammes, M.A. and Rothman, J.E. (1996) Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science*, **273**, 1396-1399.
- Finazzi, D., Cassel, D., Donaldson, J.G. and Klausner, R.D. (1994) Aluminum fluoride acts on the reversibility of ARF1-dependent coat protein binding to Golgi membranes. *J Biol Chem*, **269**, 13325-13330.
- Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R. and McMahon, H.T. (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, **419**, 361-366.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S.C., Kirchhausen, T. and Walz, T. (2004) Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature*, **432**, 573-579.
- Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. and Paris, S. (1995) Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg²⁺ levels. *J Biol Chem*, **270**, 1337-1341.
- Frank, S., Upender, S., Hansen, S.H. and Casanova, J.E. (1998) ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *J Biol Chem*, **273**, 23-27.
- Frigerio, G., Grimsey, N., Dale, M., Majoul, I. and Duden, R. (2007) Two Human ARFGAPs Associated with COP-I-Coated Vesicles. *Traffic*, **8**, 1644-1655.

- Furman, C., Short, S.M., Subramanian, R.R., Zetter, B.R. and Roberts, T.M. (2002) DEF-1/ASAP1 is a GTPase-activating protein (GAP) for ARF1 that enhances cell motility through a GAP-dependent mechanism. *J Biol Chem*, **277**, 7962-7969.
- Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T. and Mornon, J.P. (1987) Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett*, **224**, 149-155.
- Gallop, J.L. and McMahon, H.T. (2005) BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem Soc Symp*, 223-231.
- Genth, H., Aktories, K. and Just, I. (1999) Monoglucosylation of RhoA at threonine 37 blocks cytosol-membrane cycling. *J Biol Chem*, **274**, 29050-29056.
- Gieseemann, T., Jank, T., Gerhard, R., Maier, E., Just, I., Benz, R. and Aktories, K. (2006) Cholesterol-dependent pore formation of Clostridium difficile toxin A. *J Biol Chem*, **281**, 10808-10815.
- Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G. and Stenmark, H. (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo J*, **19**, 4577-4588.
- Gilman, A.G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, **56**, 615-649.
- Glick, B.S. and Malhotra, V. (1998) The curious status of the Golgi apparatus. *Cell*, **95**, 883-889.
- Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D.R., Kular, G.S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J.M. and De Matteis, M.A. (2004) FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol*, **6**, 393-404.
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D. and De Matteis, M.A. (1999) ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex. *Nat Cell Biol*, **1**, 280-287.
- Goldberg, J. (1998) Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*, **95**, 237-248.
- Goldberg, J. (1999) Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis. *Cell*, **96**, 893-902.
- Goldberg, J. (2000) Decoding of sorting signals by coatamer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell*, **100**, 671-679.
- Golovanov, A.P., Hawkins, D., Barsukov, I., Badii, R., Bokoch, G.M., Lian, L.Y. and Roberts, G.C. (2001) Structural consequences of site-directed mutagenesis in flexible protein domains: NMR characterization of the L(55,56)S mutant of RhoGDI. *Eur J Biochem*, **268**, 2253-2260.

- Gordon, J.I., Duronio, R.J., Rudnick, D.A., Adams, S.P. and Gokel, G.W. (1991) Protein N-myristoylation. *J Biol Chem*, **266**, 8647-8650.
- Gorter, E. and Grendel, F. (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med*, **41**, 439-443.
- Greasley, S.E., Jhoti, H., Teahan, C., Solari, R., Fensome, A., Thomas, G.M., Cockcroft, S. and Bax, B. (1995) The structure of rat ADP-ribosylation factor-1 (ARF-1) complexed to GDP determined from two different crystal forms. *Nat Struct Biol*, **2**, 797-806.
- Greco, A., Ho, J.G., Lin, S.J., Palcic, M.M., Rupnik, M. and Ng, K.K. (2006) Carbohydrate recognition by Clostridium difficile toxin A. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 460-461.
- Gurkan, C., Stagg, S.M., Lapointe, P. and Balch, W.E. (2006) The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 727-738.
- Hancock, J.F. (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 456-462.
- Hancock, J.F., Paterson, H. and Marshall, C.J. (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*, **63**, 133-139.
- Harris, S.L. and Waters, M.G. (1996) Localization of a yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport. *J Cell Biol*, **132**, 985-998.
- Ho, J.G., Greco, A., Rupnik, M. and Ng, K.K. (2005) Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from Clostridium difficile toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 18373-18378.
- Hoefen, R.J. and Berk, B.C. (2006) The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci*, **119**, 1469-1475.
- Hoffman, G.R., Nassar, N. and Cerione, R.A. (2000) Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell*, **100**, 345-356.
- Hoffman, G.R., Rahl, P.B., Collins, R.N. and Cerione, R.A. (2003) Conserved structural motifs in intracellular trafficking pathways: structure of the gammaCOP appendage domain. *Mol Cell*, **12**, 615-625.
- Hope, M.J., Redelmeier, T.E., Wong, K.F., Rodriguez, W. and Cullis, P.R. (1989) Phospholipid asymmetry in large unilamellar vesicles induced by transmembrane pH gradients. *Biochemistry*, **28**, 4181-4187.
- Hosobuchi, M., Kreis, T. and Schekman, R. (1992) SEC21 is a gene required for ER to Golgi protein transport that encodes a subunit of a yeast coatomer. *Nature*, **360**, 603-605.

- Hristova, K., Wimley, W.C., Mishra, V.K., Anantharamiah, G.M., Segrest, J.P. and White, S.H. (1999) An amphipathic alpha-helix at a membrane interface: a structural study using a novel X-ray diffraction method. *J Mol Biol*, **290**, 99-117.
- Huang, H.W. (2006) Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochim Biophys Acta*, **1758**, 1292-1302.
- Hubner, S., Couvillon, A.D., Kas, J.A., Bankaitis, V.A., Vegners, R., Carpenter, C.L. and Janmey, P.A. (1998) Enhancement of phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) activity by membrane curvature and inositol-phospholipid-binding peptides. *Eur J Biochem*, **258**, 846-853.
- Inoue, H. and Randazzo, P.A. (2007) Arf GAPs and Their Interacting Proteins. *Traffic*.
- Jackson, M.R., Nilsson, T. and Peterson, P.A. (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J*, **9**, 3153-3162.
- Jackson, T.R., Brown, F.D., Nie, Z., Miura, K., Foroni, L., Sun, J., Hsu, V.W., Donaldson, J.G. and Randazzo, P.A. (2000) ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. *J Cell Biol*, **151**, 627-638.
- Johnson, R.P., Niggli, V., Durrer, P. and Craig, S.W. (1998) A conserved motif in the tail domain of vinculin mediates association with and insertion into acidic phospholipid bilayers. *Biochemistry*, **37**, 10211-10222.
- Kahn, R.A. and Gilman, A.G. (1986) The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *J Biol Chem*, **261**, 7906-7911.
- Kahn, R.A., Randazzo, P., Serafini, T., Weiss, O., Rulka, C., Clark, J., Amherdt, M., Roller, P., Orci, L. and Rothman, J.E. (1992) The amino terminus of ADP-ribosylation factor (ARF) is a critical determinant of ARF activities and is a potent and specific inhibitor of protein transport. *J Biol Chem*, **267**, 13039-13046.
- Kam, J.L., Miura, K., Jackson, T.R., Gruschus, J., Roller, P., Stauffer, S., Clark, J., Aneja, R. and Randazzo, P.A. (2000) Phosphoinositide-dependent activation of the ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein ASAP1. Evidence for the pleckstrin homology domain functioning as an allosteric site. *J Biol Chem*, **275**, 9653-9663.
- Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S. and Nakayama, K. (2002) GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic*, **3**, 483-495.
- Kitadokoro, K., Kamitani, S., Miyazawa, M., Hanajima-Ozawa, M., Fukui, A., Miyake, M. and Horiguchi, Y. (2007) Crystal structures reveal a thiol protease-like catalytic triad in the C-terminal region of Pasteurella multocida toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 5139-5144.

- Kjeldgaard, M., Nyborg, J. and Clark, B.F. (1996) The GTP binding motif: variations on a theme. *Faseb J*, **10**, 1347-1368.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J. and Stoter, M. (2005) The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal*, **17**, 675-689.
- Kol, M.A., de Kroon, A.I., Killian, J.A. and de Kruijff, B. (2004) Transbilayer movement of phospholipids in biogenic membranes. *Biochemistry*, **43**, 2673-2681.
- Kooijman, E.E., Chupin, V., de Kruijff, B. and Burger, K.N. (2003) Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. *Traffic*, **4**, 162-174.
- Kutateladze, T. and Overduin, M. (2001) Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain. *Science*, **291**, 1793-1796.
- Kutateladze, T.G. (2006) Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition and membrane docking by the FYVE domain. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 868-877.
- Kutateladze, T.G., Capelluto, D.G., Ferguson, C.G., Cheever, M.L., Kutateladze, A.G., Prestwich, G.D. and Overduin, M. (2004) Multivalent mechanism of membrane insertion by the FYVE domain. *J Biol Chem*, **279**, 3050-3057.
- Kutateladze, T.G., Ogburn, K.D., Watson, W.T., de Beer, T., Emr, S.D., Burd, C.G. and Overduin, M. (1999) Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain. *Mol Cell*, **3**, 805-811.
- Lange, Y., Swaisgood, M.H., Ramos, B.V. and Steck, T.L. (1989) Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, **264**, 3786-3793.
- Lanoix, J., Ouwendijk, J., Lin, C.C., Stark, A., Love, H.D., Ostermann, J. and Nilsson, T. (1999) GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COP I vesicles. *Embo J*, **18**, 4935-4948.
- Lanoix, J., Ouwendijk, J., Stark, A., Szafer, E., Cassel, D., Dejgaard, K., Weiss, M. and Nilsson, T. (2001) Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *J Cell Biol*, **155**, 1199-1212.
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O.A., Ochoa, G.C., Farsad, K., Wenk, M.R. and De Camilli, P. (2002) Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*, **297**, 1193-1196.
- Lee, M.C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M. and Schekman, R. (2005a) Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell*, **122**, 605-617.
- Lee, S.A., Eyson, R., Cheever, M.L., Geng, J., Verkhusha, V.V., Burd, C., Overduin, M. and Kutateladze, T.G. (2005b) Targeting of the FYVE domain to endosomal membranes is regulated by a histidine switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13052-13057.

- Lee, S.Y., Yang, J.S., Hong, W., Premont, R.T. and Hsu, V.W. (2005c) ARFGAP1 plays a central role in coupling COPI cargo sorting with vesicle formation. *J Cell Biol*, **168**, 281-290.
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H. and Cosson, P. (1994) Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*, **79**, 1199-1207.
- Letourneur, F., Hennecke, S., Demolliere, C. and Cosson, P. (1995) Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E. *J Cell Biol*, **129**, 971-978.
- Leventis, R. and Silviu, J.R. (1998) Lipid-binding characteristics of the polybasic carboxy-terminal sequence of K-ras4B. *Biochemistry*, **37**, 7640-7648.
- Lewis, M.J. and Pelham, H.R. (1990) A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature*, **348**, 162-163.
- Lewis, M.J. and Pelham, H.R. (1992) Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*, **68**, 353-364.
- Lewis, S.M., Poon, P.P., Singer, R.A., Johnston, G.C. and Spang, A. (2004) The ArfGAP Glo3 is required for the generation of COPI vesicles. *Mol Biol Cell*, **15**, 4064-4072.
- Lian, L.Y., Barsukov, I., Golovanov, A.P., Hawkins, D.I., Badii, R., Sze, K.H., Keep, N.H., Bokoch, G.M. and Roberts, G.C. (2000) Mapping the binding site for the GTP-binding protein Rac-1 on its inhibitor RhoGDI-1. *Structure*, **8**, 47-55.
- Lippincott-Schwartz, J. and Liu, W. (2003) Membrane trafficking: coat control by curvature. *Nature*, **426**, 507-508.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L.C., Bonifacino, J.S. and Klausner, R.D. (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*, **56**, 801-813.
- Liu, W., Duden, R., Phair, R.D. and Lippincott-Schwartz, J. (2005) ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells. *J Cell Biol*, **168**, 1053-1063.
- Losev, E., Reinke, C.A., Jellen, J., Strongin, D.E., Bevis, B.J. and Glick, B.S. (2006) Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature*, **441**, 1002-1006.
- Lowe, M. and Kreis, T.E. (1995) In vitro assembly and disassembly of coatomer. *J Biol Chem*, **270**, 31364-31371.
- Macia, E., Chabre, M. and Franco, M. (2001) Specificities for the small G proteins ARF1 and ARF6 of the guanine nucleotide exchange factors ARNO and EFA6. *J Biol Chem*, **276**, 24925-24930.

- Macia, E., Paris, S. and Chabre, M. (2000) Binding of the PH and polybasic C-terminal domains of ARNO to phosphoinositides and to acidic lipids. *Biochemistry*, **39**, 5893-5901.
- Majoul, I., Straub, M., Hell, S.W., Duden, R. and Soling, H.D. (2001) KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell*, **1**, 139-153.
- Makler, V., Cukierman, E., Rotman, M., Admon, A. and Cassel, D. (1995) ADP-ribosylation factor-directed GTPase-activating protein. Purification and partial characterization. *J Biol Chem*, **270**, 5232-5237.
- Mandiyani, V., Andreev, J., Schlessinger, J. and Hubbard, S.R. (1999) Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *Embo J*, **18**, 6890-6898.
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*, **27**, 97-106.
- Martinez-Menarguez, J.A., Prekeris, R., Oorschot, V.M., Scheller, R., Slot, J.W., Geuze, H.J. and Klumperman, J. (2001) Peri-Golgi vesicles contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport. *J Cell Biol*, **155**, 1213-1224.
- Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y. and Mochizuki, N. (2006) Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *Embo J*, **25**, 2889-2897.
- Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. and Nakano, A. (2006) Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature*, **441**, 1007-1010.
- Mattila, P.K., Pykalainen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V.O., Vihinen, H., Jokitalo, E. and Lappalainen, P. (2007) Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P2-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *J Cell Biol*, **176**, 953-964.
- Maxfield, F.R. and Tabas, I. (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, **438**, 612-621.
- Melancon, P., Glick, B.S., Malhotra, V., Weidman, P.J., Serafini, T., Gleason, M.L., Orci, L. and Rothman, J.E. (1987) Involvement of GTP-binding "G" proteins in transport through the Golgi stack. *Cell*, **51**, 1053-1062.
- Menetrey, J., Perderiset, M., Cicolari, J., Dubois, T., Elkhatib, N., El Khadali, F., Franco, M., Chavrier, P. and Houdusse, A. (2007) Structural basis for ARF1-mediated recruitment of ARHGAP21 to Golgi membranes. *Embo J*, **26**, 1953-1962.
- Mesmin, B., Drin, G., Levi, S., Rawet, M., Cassel, D., Bigay, J. and Antony, B. (2007) Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry*, **46**, 1779-1790.

- Mesmin, B., Robbe, K., Geny, B., Luton, F., Brandolin, G., Popoff, M.R. and Antony, B. (2004) A phosphatidylserine-binding site in the cytosolic fragment of *Clostridium sordellii* lethal toxin facilitates glucosylation of membrane-bound Rac and is required for cytotoxicity. *J Biol Chem*, **279**, 49876-49882.
- Milne, D.M., Looby, P. and Meek, D.W. (2001) Catalytic activity of protein kinase CK1 delta (casein kinase 1delta) is essential for its normal subcellular localization. *Exp Cell Res*, **263**, 43-54.
- Misra, S. and Hurley, J.H. (1999) Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell*, **97**, 657-666.
- Moelleken, J. (2005) Functional characterisation and ultrastructural localisation of isoforms of the coat protein complex coatomer. *Thesis. Biochemiezentrum Heidelberg. Fakultät für Biowissenschaften, Heidelberg.*
- Moelleken, J., Malsam, J., Betts, M.J., Movafeghi, A., Reckmann, I., Meissner, I., Hellwig, A., Russell, R.B., Sollner, T., Brugger, B. and Wieland, F.T. (2007) Differential localization of coatomer complex isoforms within the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 4425-4430.
- Morre, J., Merlin, L.M. and Keenan, T.W. (1969) Localization of glycosyl transferase activities in a Golgi apparatus-rich fraction isolated from rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, **37**, 813-819.
- Morris, S.A., Ahle, S. and Ungewickell, E. (1989) Clathrin-coated vesicles. *Curr Opin Cell Biol*, **1**, 684-690.
- Mossessova, E., Gulbis, J.M. and Goldberg, J. (1998) Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human Arp2/3 and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell*, **92**, 415-423.
- Munro, S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**, 377-388.
- Munro, S. and Pelham, H.R. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*, **48**, 899-907.
- Murray, D., Arbuzova, A., Honig, B. and McLaughlin, S. (2002) The role of electrostatic and nonpolar interactions in the association of peripheral proteins with membranes. In *Current Topics in Membranes*. Academic Press, New York, Vol. 52, pp. 277-307.
- Natsume, W., Tanabe, K., Kon, S., Yoshida, N., Watanabe, T., Torii, T. and Satake, M. (2006) SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network. *Mol Biol Cell*, **17**, 2592-2603.
- Nickel, W., Malsam, J., Gorgas, K., Ravazzola, M., Jenne, N., Helms, J.B. and Wieland, F.T. (1998) Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *J Cell Sci*, **111 (Pt 20)**, 3081-3090.

- Nie, Z., Boehm, M., Boja, E.S., Vass, W.C., Bonifacino, J.S., Fales, H.M. and Randazzo, P.A. (2003) Specific regulation of the adaptor protein complex AP-3 by the Arf GAP AGAP1. *Dev Cell*, **5**, 513-521.
- Nie, Z., Fei, J., Premont, R.T. and Randazzo, P.A. (2005) The Arf GAPs AGAP1 and AGAP2 distinguish between the adaptor protein complexes AP-1 and AP-3. *J Cell Sci*, **118**, 3555-3566.
- Nie, Z., Stanley, K.T., Stauffer, S., Jacques, K.M., Hirsch, D.S., Takei, J. and Randazzo, P.A. (2002) AGAP1, an endosome-associated, phosphoinositide-dependent ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein that affects actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **277**, 48965-48975.
- Nishiya, N., Kiosses, W.B., Han, J. and Ginsberg, M.H. (2005) An alpha4 integrin-paxillin-Arf-GAP complex restricts Rac activation to the leading edge of migrating cells. *Nat Cell Biol*, **7**, 343-352.
- Nomanbhoy, T.K., Erickson, J.W. and Cerione, R.A. (1999) Kinetics of Cdc42 membrane extraction by Rho-GDI monitored by real-time fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*, **38**, 1744-1750.
- Novick, P., Ferro, S. and Schekman, R. (1981) Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell*, **25**, 461-469.
- Novick, P., Field, C. and Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, **21**, 205-215.
- Novikoff, A.B. and Goldfischer, S. (1961) Nucleosidediphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **47**, 802-810.
- Nuscher, B., Kamp, F., Mehnert, T., Odoy, S., Haass, C., Kahle, P.J. and Beyer, K. (2004) Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study. *J Biol Chem*, **279**, 21966-21975.
- Odorizzi, G., Babst, M. and Emr, S.D. (2000) Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci*, **25**, 229-235.
- Ogasawara, M., Kim, S.C., Adamik, R., Togawa, A., Ferrans, V.J., Takeda, K., Kirby, M., Moss, J. and Vaughan, M. (2000) Similarities in function and gene structure of cytohesin-4 and cytohesin-1, guanine nucleotide-exchange proteins for ADP-ribosylation factors. *J Biol Chem*, **275**, 3221-3230.
- Oprins, A., Duden, R., Kreis, T.E., Geuze, H.J. and Slot, J.W. (1993) Beta-COP localizes mainly to the cis-Golgi side in exocrine pancreas. *J Cell Biol*, **121**, 49-59.
- Orci, L., Glick, B.S. and Rothman, J.E. (1986) A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell*, **46**, 171-184.

- Orci, L., Palmer, D.J., Amherdt, M. and Rothman, J.E. (1993) Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature*, **364**, 732-734.
- Orci, L., Schekman, R. and Perrelet, A. (1996) Interleaflet clear space is reduced in the membrane of COP I and COP II-coated buds/vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8968-8970.
- Orci, L., Stannes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T.H. and Rothman, J.E. (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell*, **90**, 335-349.
- Owen, D.J., Collins, B.M. and Evans, P.R. (2004) Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 153-191.
- Palade, G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, **189**, 347-358.
- Paleotti, O., Macia, E., Luton, F., Klein, S., Partisani, M., Chardin, P., Kirchhausen, T. and Franco, M. (2005) The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J Biol Chem*, **280**, 21661-21666.
- Paris, S., Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Bigay, J., Antonny, B., Chabre, M. and Chardin, P. (1997) Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *J Biol Chem*, **272**, 22221-22226.
- Parnis, A., Rawet, M., Regev, L., Barkan, B., Rotman, M., Gaitner, M. and Cassel, D. (2006) Golgi localization determinants in ArfGAP1 and in new tissue-specific ArfGAP1 isoforms. *J Biol Chem*, **281**, 3785-3792.
- Pasqualato, S., Renault, L. and Cherfils, J. (2002) Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for 'front-back' communication. *EMBO Rep*, **3**, 1035-1041.
- Pearse, B.M. and Robinson, M.S. (1990) Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol*, **6**, 151-171.
- Peitzsch, R.M. and McLaughlin, S. (1993) Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry*, **32**, 10436-10443.
- Pepperkok, R., Whitney, J.A., Gomez, M. and Kreis, T.E. (2000) COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J Cell Sci*, **113 (Pt 1)**, 135-144.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R. and McMahon, H.T. (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, **303**, 495-499.

- Peters, P.J., Hsu, V.W., Ooi, C.E., Finazzi, D., Teal, S.B., Oorschot, V., Donaldson, J.G. and Klausner, R.D. (1995) Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *J Cell Biol*, **128**, 1003-1017.
- Peyroche, A., Antonny, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. and Jackson, C.L. (1999) Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell*, **3**, 275-285.
- Peyroche, A., Paris, S. and Jackson, C.L. (1996) Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature*, **384**, 479-481.
- Pfeifer, G., Schirmer, J., Leemhuis, J., Busch, C., Meyer, D.K., Aktories, K. and Barth, H. (2003) Cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin B. Translocation of the N-terminal catalytic domain into the cytosol of eukaryotic cells. *J Biol Chem*, **278**, 44535-44541.
- Philips, M.R., Pillinger, M.H., Staud, R., Volker, C., Rosenfeld, M.G., Weissmann, G. and Stock, J.B. (1993) Carboxyl methylation of Ras-related proteins during signal transduction in neutrophils. *Science*, **259**, 977-980.
- Pomorski, T., Holthuis, J.C., Herrmann, A. and van Meer, G. (2004) Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J Cell Sci*, **117**, 805-813.
- Poon, P.P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R.A. and Johnston, G.C. (1999) Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *Embo J*, **18**, 555-564.
- Poon, P.P., Wang, X., Rotman, M., Huber, I., Cukierman, E., Cassel, D., Singer, R.A. and Johnston, G.C. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* Gcs1 is an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10074-10077.
- Presley, J.F., Ward, T.H., Pfeifer, A.C., Siggia, E.D., Phair, R.D. and Lippincott-Schwartz, J. (2002) Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature*, **417**, 187-193.
- Radhakrishnan, I., Perez-Alvarado, G.C., Parker, D., Dyson, H.J., Montminy, M.R. and Wright, P.E. (1997) Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions. *Cell*, **91**, 741-752.
- Randazzo, P.A., Andrade, J., Miura, K., Brown, M.T., Long, Y.Q., Stauffer, S., Roller, P. and Cooper, J.A. (2000a) The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4011-4016.
- Randazzo, P.A. and Kahn, R.A. (1994) GTP hydrolysis by ADP-ribosylation factor is dependent on both an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein and acid phospholipids. *J Biol Chem*, **269**, 10758-10763.

- Randazzo, P.A., Nie, Z., Miura, K. and Hsu, V.W. (2000b) Molecular aspects of the cellular activities of ADP-ribosylation factors. *Sci STKE*, **2000**, RE1.
- Reineke, J., Tenzer, S., Rupnik, M., Koschinski, A., Hasselmayer, O., Schratzenholz, A., Schild, H. and von Eichel-Streiber, C. (2007) Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*, **446**, 415-419.
- Reinert, D.J., Jank, T., Aktories, K. and Schulz, G.E. (2005) Structural basis for the function of *Clostridium difficile* toxin B. *J Mol Biol*, **351**, 973-981.
- Reinhard, C., Harter, C., Bremser, M., Brugger, B., Sohn, K., Helms, J.B. and Wieland, F. (1999) Receptor-induced polymerization of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1224-1228.
- Renault, L., Guibert, B. and Cherfils, J. (2003) Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature*, **426**, 525-530.
- Resh, M.D. (1996) Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal*, **8**, 403-412.
- Resh, M.D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1451**, 1-16.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Smerdon, S.J. and Gamblin, S.J. (1997) Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature*, **389**, 758-762.
- Roach, P.J. (1991) Multisite and hierarchical protein phosphorylation. *J Biol Chem*, **266**, 14139-14142.
- Robbe, K., Otto-Bruc, A., Chardin, P. and Antonny, B. (2003) Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J Biol Chem*, **278**, 4756-4762.
- Robineau, S., Chabre, M. and Antonny, B. (2000) Binding site of brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9913-9918.
- Rothman, J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, **372**, 55-63.
- Rothman, J.E. and Wieland, F.T. (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science*, **272**, 227-234.
- Sankaran, V.G., Klein, D.E., Sachdeva, M.M. and Lemmon, M.A. (2001) High-affinity binding of a FYVE domain to phosphatidylinositol 3-phosphate requires intact phospholipid but not FYVE domain oligomerization. *Biochemistry*, **40**, 8581-8587.
- Santy, L.C. and Casanova, J.E. (2002) GTPase signaling: bridging the GAP between ARF and Rho. *Curr Biol*, **12**, R360-362.

- Sasaki, T., Kato, M. and Takai, Y. (1993) Consequences of weak interaction of rho GDI with the GTP-bound forms of rho p21 and rac p21. *J Biol Chem*, **268**, 23959-23963.
- Saxena, K., Gaitatzes, C., Walsh, M.T., Eck, M., Neer, E.J. and Smith, T.F. (1996) Analysis of the physical properties and molecular modeling of Sec13: A WD repeat protein involved in vesicular traffic. *Biochemistry*, **35**, 15215-15221.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. and Wittinghofer, A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*, **277**, 333-338.
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R. and Wittinghofer, A. (1998) GTPase-activating proteins: helping hands to complement an active site. *Trends Biochem Sci*, **23**, 257-262.
- Schekman, R. and Orci, L. (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science*, **271**, 1526-1533.
- Schmidt, W.K., Tam, A., Fujimura-Kamada, K. and Michaelis, S. (1998) Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11175-11180.
- Seabra, M.C., Reiss, Y., Casey, P.J., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1991) Protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase share a common alpha subunit. *Cell*, **65**, 429-434.
- Segrest, J.P., De Loof, H., Dohlman, J.G., Brouillette, C.G. and Anantharamaiah, G.M. (1990) Amphipathic helix motif: classes and properties. *Proteins*, **8**, 103-117.
- Sehr, P., Joseph, G., Genth, H., Just, I., Pick, E. and Aktories, K. (1998) Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry*, **37**, 5296-5304.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R.A. and Rothman, J.E. (1991a) ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell*, **67**, 239-253.
- Serafini, T., Stenbeck, G., Brecht, A., Lottspeich, F., Orci, L., Rothman, J.E. and Wieland, F.T. (1991b) A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin. *Nature*, **349**, 215-220.
- Shahinian, S. and Silvius, J.R. (1995) Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry*, **34**, 3813-3822.
- Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., Liu, Z.J., Wang, B.C., Yamamoto, M., Terada, T., Miyazawa, A., Tanaka, A., Sugano, S., Shirouzu, M., Nagayama, K., Takenawa, T. and Yokoyama, S. (2007) Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell*, **129**, 761-772.

- Silvius, J.R. and l'Heureux, F. (1994) Fluorimetric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers. *Biochemistry*, **33**, 3014-3022.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Smeland, T.E., Seabra, M.C., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1994) Geranylgeranylated Rab proteins terminating in Cys-Ala-Cys, but not Cys-Cys, are carboxyl-methylated by bovine brain membranes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10712-10716.
- Sohn, K., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Bremser, M., Lottspeich, F., Fiedler, K., Helms, J.B. and Wieland, F.T. (1996) A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol*, **135**, 1239-1248.
- Spang, A., Matsuoka, K., Hamamoto, S., Schekman, R. and Orci, L. (1998) Coatomer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11199-11204.
- Springer, S., Chen, E., Duden, R., Marzioch, M., Rowley, A., Hamamoto, S., Merchant, S. and Schekman, R. (2000) The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4034-4039.
- Springer, S., Spang, A. and Schekman, R. (1999) A primer on vesicle budding. *Cell*, **97**, 145-148.
- Sprong, H., van der Sluijs, P. and van Meer, G. (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 504-513.
- Stagg, S.M., Gurkan, C., Fowler, D.M., LaPointe, P., Foss, T.R., Potter, C.S., Carragher, B. and Balch, W.E. (2006) Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature*, **439**, 234-238.
- Stagg, S.M., LaPointe, P. and Balch, W.E. (2007) Structural design of cage and coat scaffolds that direct membrane traffic. *Curr Opin Struct Biol*, **17**, 221-228.
- Stamnes, M.A. and Rothman, J.E. (1993) The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell*, **73**, 999-1005.
- Stearns, T., Willingham, M.C., Botstein, D. and Kahn, R.A. (1990) ADP-ribosylation factor is functionally and physically associated with the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1238-1242.
- Stenbeck, G., Harter, C., Brecht, A., Herrmann, D., Lottspeich, F., Orci, L. and Wieland, F.T. (1993) beta'-COP, a novel subunit of coatomer. *Embo J*, **12**, 2841-2845.
- Stenmark, H. and Gillooly, D.J. (2001) Intracellular trafficking and turnover of phosphatidylinositol 3-phosphate. *Semin Cell Dev Biol*, **12**, 193-199.

- Sun, Z., Anderl, F., Frohlich, K., Zhao, L., Hanke, S., Brugger, B., Wieland, F. and Bethune, J. (2007) Multiple and stepwise interactions between coatamer and ADP-ribosylation factor-1 (Arf1)-GTP. *Traffic*, **8**, 582-593.
- Szafer, E., Pick, E., Rotman, M., Zuck, S., Huber, I. and Cassel, D. (2000) Role of coatamer and phospholipids in GTPase-activating protein-dependent hydrolysis of GTP by ADP-ribosylation factor-1. *J Biol Chem*, **275**, 23615-23619.
- Szafer, E., Rotman, M. and Cassel, D. (2001) Regulation of GTP hydrolysis on ADP-ribosylation factor-1 at the Golgi membrane. *J Biol Chem*, **276**, 47834-47839.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V. and De Camilli, P. (1999) Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*, **1**, 33-39.
- Tanford, C. (1980) *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes, second edition*. John Wiley and sons, Inc, New York.
- Tanigawa, G., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Helms, J.B. and Rothman, J.E. (1993) Hydrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J Cell Biol*, **123**, 1365-1371.
- ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S.C. and Kirchhausen, T. (1998) Atomic structure of clathrin: a beta propeller terminal domain joins an alpha zigzag linker. *Cell*, **95**, 563-573.
- Traub, L.M., Ostrom, J.A. and Kornfeld, S. (1993) Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. *J Cell Biol*, **123**, 561-573.
- Tsuchiya, M., Price, S.R., Tsai, S.C., Moss, J. and Vaughan, M. (1991) Molecular identification of ADP-ribosylation factor mRNAs and their expression in mammalian cells. *J Biol Chem*, **266**, 2772-2777.
- Ulmer, T.S., Bax, A., Cole, N.B. and Nussbaum, R.L. (2005) Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J Biol Chem*, **280**, 9595-9603.
- van den Brink-van der Laan, E., Killian, J.A. and de Kruijff, B. (2004) Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta*, **1666**, 275-288.
- van Meer, G. (1998) Lipids of the Golgi membrane. *Trends Cell Biol*, **8**, 29-33.
- van Meer, G. and Sprong, H. (2004) Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 373-378.
- Vigers, G.P., Crowther, R.A. and Pearse, B.M. (1986) Three-dimensional structure of clathrin cages in ice. *Embo J*, **5**, 529-534.
- Walker, M.W., Bobak, D.A., Tsai, S.C., Moss, J. and Vaughan, M. (1992) GTP but not GDP analogues promote association of ADP-ribosylation factors, 20-kDa protein activators

- of cholera toxin, with phospholipids and PC-12 cell membranes. *J Biol Chem*, **267**, 3230-3235.
- Walther, T.C., Alves, A., Pickersgill, H., Liodice, I., Hetzer, M., Galy, V., Hulsman, B.B., Kocher, T., Wilm, M., Allen, T., Mattaj, I.W. and Doye, V. (2003) The conserved Nup107-160 complex is critical for nuclear pore complex assembly. *Cell*, **113**, 195-206.
- Wang, X., Hoekstra, M.F., DeMaggio, A.J., Dhillon, N., Vancura, A., Kuret, J., Johnston, G.C. and Singer, R.A. (1996) Prenylated isoforms of yeast casein kinase I, including the novel Yck3p, suppress the *gcs1* blockage of cell proliferation from stationary phase. *Mol Cell Biol*, **16**, 5375-5385.
- Waters, M.G., Serafini, T. and Rothman, J.E. (1991) 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, **349**, 248-251.
- Watson, P.J., Frigerio, G., Collins, B.M., Duden, R. and Owen, D.J. (2004) Gamma-COP appendage domain - structure and function. *Traffic*, **5**, 79-88.
- Whur, P., Herscovics, A. and Leblond, C.P. (1969) Radioautographic visualization of the incorporation of galactose-3H and mannose-3H by rat thyroids in vitro in relation to the stages of thyroglobulin synthesis. *J Cell Biol*, **43**, 289-311.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Epan, R.M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W.L., MacDonald, D.L. and Bienert, M. (1997) Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry*, **36**, 12869-12880.
- Wong, T.A., Fairn, G.D., Poon, P.P., Shmulevitz, M., McMaster, C.R., Singer, R.A. and Johnston, G.C. (2005) Membrane metabolism mediated by Sec14 family members influences Arf GTPase activating protein activity for transport from the trans-Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12777-12782.
- Wu, Y.W., Tan, K.T., Waldmann, H., Goody, R.S. and Alexandrov, K. (2007) Interaction analysis of prenylated Rab GTPase with Rab escort protein and GDP dissociation inhibitor explains the need for both regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Yahara, N., Sato, K. and Nakano, A. (2006) The Arf1p GTPase-activating protein Glo3p executes its regulatory function through a conserved repeat motif at its C-terminus. *J Cell Sci*, **119**, 2604-2612.
- Yanagisawa, L.L., Marchena, J., Xie, Z., Li, X., Poon, P.P., Singer, R.A., Johnston, G.C., Randazzo, P.A. and Bankaitis, V.A. (2002) Activity of specific lipid-regulated ADP ribosylation factor-GTPase-activating proteins is required for Sec14p-dependent Golgi secretory function in yeast. *Mol Biol Cell*, **13**, 2193-2206.
- Yang, J.S., Lee, S.Y., Gao, M., Bourgoin, S., Randazzo, P.A., Premont, R.T. and Hsu, V.W. (2002) ARFGAP1 promotes the formation of COPI vesicles, suggesting function as a component of the coat. *J Cell Biol*, **159**, 69-78.

- Yoon, H.Y., Miura, K., Cuthbert, E.J., Davis, K.K., Ahvazi, B., Casanova, J.E. and Randazzo, P.A. (2006) ARAP2 effects on the actin cytoskeleton are dependent on Arf6-specific GTPase-activating-protein activity and binding to RhoA-GTP. *J Cell Sci*, **119**, 4650-4666.
- Yu, S. and Roth, M.G. (2002) Casein kinase I regulates membrane binding by ARF GAP1. *Mol Biol Cell*, **13**, 2559-2570.
- Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J*, **294 (Pt 1)**, 1-14.
- Zhao, L., Helms, J.B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J. and Wieland, F.T. (1997) Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4418-4423.
- Zimmerberg, J. (2006) Membrane biophysics. *Curr Biol*, **16**, R272-276.

RESUME

Le transport de protéines entre deux saccules golgiens, ou entre l'appareil de Golgi et le Réticulum Endoplasmique, repose sur la formation de vésicules lipidiques qui bourgeonnent d'une membrane donneuse pour fusionner ensuite avec une membrane cible. Le bourgeonnement nécessite une machinerie complexe pour déformer une membrane plane en membrane courbée. Le manteau COPI, responsable de ce phénomène, s'assemble sous le contrôle de la petite protéine G Arf1, qui se lie préalablement à la membrane lors de l'échange de son nucléotide associé. En effet, si Arf1-GDP est cytosolique, le changement de conformation induit par le GTP attache fermement cette protéine à la membrane. Arf1-GTP membranaire recrute alors le coatomer, un complexe cytosolique 30 fois plus gros, qui tout en interagissant avec les protéines 'cargos' à transporter, se polymérise en manteau. Cette polymérisation déforme alors, par une action mécanique, la bicouche lipidique en une structure sphérique, pour finalement aboutir à une petite vésicule de transport de 60 nm de diamètre.

Arf1 revient ensuite à l'état inactif, par hydrolyse du GTP en GDP, et se dissocie de la membrane, provoquant le désassemblage du manteau. La simplicité apparente de cette réaction d'hydrolyse du GTP est trompeuse, car elle intervient non pas comme un événement isolé, mais dans le contexte très spécial d'un manteau polymérisé qui recouvre la membrane. De plus la réaction de GTPase doit être finement régulée, afin de ne pas intervenir trop tôt et compromettre l'assemblage du manteau. Notre laboratoire a montré que l'activité de la protéine golgienne ArfGAP1, responsable de la désactivation d'Arf1, est hypersensible à la courbure membranaire. Ceci permettrait à ArfGAP1 de réguler de manière spatio-temporelle l'état du manteau COPI en couplant son désassemblage à la courbure membranaire qu'il a lui-même induite.

Au cours de ma thèse, j'ai montré que la dépendance d'ArfGAP1 à la courbure s'explique par la liaison préférentielle de deux de ses motifs sur la membrane courbée de petites vésicules, où l'écartement lipidique est prononcé, par rapport aux membranes planes ayant des lipides plus compactés. Ces motifs ALPS (ArfGAP1 Lipid Packing Sensor) non structurés en solution, se replient en hélices α lors de leur adsorption sur les vésicules. Ce sont des hélices amphipathiques particulières car, si elles possèdent une face hydrophobe classique, elles ont une face polaire atypique, riche en résidus sérine et thréonine et pauvre en résidus chargés. Ceci est important car ces résidus hydroxylés ne peuvent former d'interactions électrostatiques avec les têtes polaires des lipides. Ainsi, la liaison d'un motif ALPS ne repose que sur l'insertion de ses résidus hydrophobes entre les lipides, ce qui est fortement favorisé par l'écartement lipidique induit par la courbure membranaire, mais plus difficile sur une membrane plane.