

## Étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'interaction entre EFA6 et ses partenaires

Sonia Boulakirba

#### ▶ To cite this version:

Sonia Boulakirba. Étude des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'interaction entre EFA6 et ses partenaires. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT: 2015NICE4081. tel-01273296

## HAL Id: tel-01273296 https://theses.hal.science/tel-01273296

Submitted on 12 Feb 2016

**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.

#### Université Nice Sophia-Antipolis.UFR Sciences

Ecole doctorale Sciences de la vie et de la Santé - ED85

Thèse

Présentée pour obtenir le titre de

#### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS

Mention : Interactions moléculaires et cellulaires

Présentée et soutenue par

#### Sonia BOULAKIRBA

UMR 7275 CNRS / UNS - IPMC - Sophia Antipolis

# Etude des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'interaction entre EFA6 et ses partenaires

Thèse dirigée par Michel FRANCO

Soutenue le 13 Novembre 2015 devant le jury composé de :

Prof. Laurent Counillon

Dr. Christophe Lamaze

Dr. Nicolas Vitale

Dr. Jacqueline Cherfils

Dr. Michel Franco

Président de jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

### **Remerciements**

Je tenais tout d'abord à remercier chaleureusement mes rapporteurs Nicolas Vitale et Christophe Lamaze pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi que les membres du jury Jacqueline Cherfils et Laurent Counillon.

Un grand merci à mon laboratoire d'accueil pour m'avoir supportée pendant ces 3 ans de thèse et les 2 ans de Master (parce que même pendant mon M2 je ne vous ai pas laissé tranquilles). Eric je te fais une déclaration de kiffitude. Toutes tes chansons foireuses vont me manquer. Le petit bonhomme en mousse, Max Boublil, les fatals bazooka, ça m'enerveeeeeee... Notre culture discographique est incomparable !!! Merci Fred, toujours à l'écoute et de bons conseils. Tu me fais trop rire à part quand tu fais exploser des tubes avec la carbo, tu sais que je suis traumatisée maintenant. Par contre, en trois ans tu n'as pas réussi à me faire arrêter la Redbull !!

Maria, Maria, Maria. Ma maman du labo, je ne vais pas m'étaler mais tu sais déjà ce que je pense. Un immense merci. Tu as toujours été là pour moi, j'ai toujours pu t'appeler à n'importe quel moment. Tu m'as aidé à traverser et a tenir pendant les moments difficiles et je pourrais jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fais pour moi. Je t'em ... brasse très fort.

Pour finir, le chef !! Je me rappellerai toujours l'entretien pour le stage de M1, quand tu m'as dit que tu venais de Ramatuelle je me suis dis que tu étais obligé de me prendre en stage. Mais tu ne savais pas dans quoi tu t'embarquais. Je compte plus les « y'en a marre »!! Tu m'as fait découvrir ce métier et tu m'as donné envie de continuer. Même si cette thèse n'a pas été facile, c'est le moins que l'on puisse dire, on est arrivé au bout !! Tu as toujours été à l'écoute et tes conseils m'ont permis de grandir pendant ces 5 années. Merci pour tout ce que tu m'as apporté et appris, aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Tu m'as surtout appris à râler mais une chose est sure j'ai de la marge pour arriver à ton niveau.

Merci merci merci à vous tous pour ces années qui malgré les coups durs resteront gravées en moi !

J'ai pu faire des belles rencontres à la fac et à l'institut même si je suis une sauvage. Merci à l'équipe Lingueglia de m'avoir accueillie pendant mon stage de Master 2 ! Mon Thomthom

mon Seb et Delphine vous êtes au top ne changez rien. J'ai passé d'excellents moments avec vous et merci pour votre soutien !! Mes amis sportifs Miled, Thomas, Carmelo va falloir continuer à assurer au cross training !!! Je tiens aussi à remercier Anne Sophie, Nathalie, Céline, Carmen et Mauro, Thomas Maurin (on a bien rigolé en salle de radioactivité), Antoine, Mabrouka, Ophélia, Thierry (merci pour tes encouragements et ton soutien) et tous ceux que j'ai pu rencontrer à l'institut. Ca a été un plaisir de vous côtoyer pendant ces cinq années.

Un immense merci à mes amis. Ma binomette !! Minus et cortex à la conquête du monde. Vive l'alphabet. Quand je t'ai vu débarquer à cette séance de TP, je me suis dis avec qui je vais tomber. Et depuis on est inséparable. Même si on n'y croyait pas, même si on y est allé au talent à la plupart des exams on y est arrivé. T'es la meilleure ma binomette !! Ebru, mon double, tu sais ce que je pense. Rien que de repenser à nos fous rires je rigole encore ! Ma Nanette 12 ans d'une belle amitié, merci d'être la tu es une personne formidable. Comme beaucoup de monde me l'a dit je ne peux pas oublier de remercier FITLANE ! J'y ai passé presque autant de temps qu'au laboratoire et j'ai pu y faire de très belles rencontres ! Merci Ludo et Wanda, c'est avec vous que j'ai commencé, Agnes (mammmmmmmiiii), on est les mêmes toutes les deux, tu arrives toujours à me booster, Daniel (papy), mon confident toujours à l'écoute, mon Guy, tu fais plus de catastrophe que moi maintenant, et Thomas Baby coach (la famille on est connecté tout les deux) parce que tout est une question de mental, quand cerveau veut corps veut. Vous êtes des personnes extraordinaires et vous m'avez permis de tenir le coup pendant cette dernière ligne droite. Grace à toutes nos rigolades et nos défis j'ai pu m'évader, me défouler et dépasser mes limites! Merci mes Ksos. Merci à mes grands frères pour tout ce que vous avez fait pour nous. Titi, Kamal, Nour, Fred, Samy, Mickey, Mathieu et les autres garçons vous êtes de belles personnes au cœur pur ! On a de la chance de vous avoir toujours auprès de nous et Eliesse serait fier de vous!

Pour finir je tiens à remercier ma famille sans qui je n'aurais rien pu faire. Mous et Helene, Linda, Zozo et Sabrina, Elodie et ma Chonchonette Izia. C'est grâce à vous que j'en suis là. Rien n'est plus important que vous pour moi. « Tout ce que je suis ou aspire à devenir je le dois à ma mère, mon ange. »

A ma mère et mon frère Eliesse, c'est dans votre courage que j'ai puisé ma force.

## **Abréviations principales**

AP: Adaptor Protein

Arf : ADP-rybosylation factor

ARHGAP10: Rho GTPase Activating Protein 10

ARNO: Arf nucleotide-binding site opener

Arp: Arf-related protein

Arp2/3: Actin Related Protein 2/3

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

BAR: Bin Amphiphysin Rvs

BHK: Baby Hamster Kidney

Bin: Bridging interactor

BSA: Bovine Serum Albumin

Cc: Coiled Coil

Cdc42: Cell division control protein 42 homolog

CHO: Chinese hamster ovary

CLIC/GEEC: Clathrin Independant Carrier/ GPI-AP (GlycosylPhosphatidylInositol Anchored Proteins) enriched Early Endosomal Compartments

COP: coat protein

Cpm: coups par minute

C-ter: C-terminal

Dnm1: Dynamin-related 1

DTT: dithiothréitol

EFA6: Exchange Factor for Arf6

EGF: Epidermal growth factor

EPAs: Endophilin Positive Assembies

F-BAR: Fer-cyp4 Homology

FEME: Fast Endophilin Mediated Endocytosis

GAP : GTPase Activating Protein

GBF1: Golgi-specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1

GDI: GDP Dissociation Inhibitor

GDP: Guanosine DiPhosphate

GFP: Green Fluorescent Protein

GGA: Golgi-localising, Gamma-adaptin ear domain homology, ARF-binding proteins

GPI: Glycosylphosphatidylinositol

GRAF1: GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1

GRK: G-protein Receptor Kinase

GST Glutathione S-Transferase

GTP: Guanosine TriPhosphate

- HEK: Human Embryonic Kidney cells
- HGF:Hepatocyte Growth Factor
- I-BAR: Inverted-BAR
- IL-2: Interleukine-2
- JIP: JNK interacting protein
- MMPs: Matrix MetalloProteinases
- Myr: myristillé
- NEDD9: Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9
- N-WASP: Neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein
- Pbr: poly basic region
- PH: Pleckstrin Homology
- PI3K: Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
- PI3P: PhosphatidylInositol-3-Phosphate
- PIP2: PhosphatidylInositol-4,5-diPhosphate
- PRD: Proline Rich Domain
- ProC: Proline C-terminal
- ProN: Proline N-terminal
- Proteins) enriched Early Endosomal Compartments
- PS: Phosphatydil-Sérine
- PSD: Pleckstrin And Sec7 Domain containing
- PTB: PhosphoTyrosine Binding
- PX: PhoX homology domain
- Rab: Ras-like protein in the brain
- Ran: Ras-like nuclear
- Rap: Ras-related proteins
- RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
- RFP: Red Fluorescent Protein
- Rho: Ras homolog gene family
- Rpm: rotation par minute
- Rvs: Reduced viability after starvation
- Ser/Thr: Sérine/Thréonine
- SH3: Src Homology domain 3
- SNX9: Sorting Nexin 9
- SVF: sérum de veau fœtal
- TGN: Trans-Golgi-Network
- TIR-FM: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
- WASH: Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homologe
- WAVE: Wasp family Verprolin homologous protein

#### Sommaire

Introduction	
I. L'endocytose	3
A. L'endocytose dépendante de la clathrine	5
1. La clathrine	6
2. Les protéines adaptatrices	9
3. La dynamine	12
4. La synaptojanine	14
5. Les récepteurs couplés aux protéines G	15
6. Les GRKs (G-protein Receptor Kinase)	17
7. Les arrestines	19
B. L'endocytose dépendante des cavéoles	22
C. L'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles	26
D. L'endocytose à grande échelle	28
II. Les protéines à domaine BAR	30
A. Structure	30
B. Fonctions	33
C. L'endophiline	
1. Généralités	36
2. L'endophiline dans l'endocytose dépendante de la clathrine	
3. Voie d'endocytose dépendante de l'endophiline	39
4. Endophiline et pathologies	40
5. Régulation de l'endophiline	40
III. Les petites protéines G	42
A. Généralités	42
B. La famille Ras	45
C. La famille Rho	47
D. La famille Rab	49
E. La famille Ran	52
F. La famille Arf	52
1. Les protéines Arf	52
2. La protéine Arf1	56

3	La protéine Arf6	59		
IV. L	es facteurs d'échange à domaine Sec7	66		
A.	Généralités	66		
В.	Structure	67		
C.	Les facteurs d'échange à haut poids moléculaire	69		
D.	La famille des cytohésines	70		
Ε.	La famille des BRAG	70		
F.	Mécanismes de régulation	71		
G.	Le facteur d'échange EFA6	72		
Résultats partie 1 : Etude de l'interaction entre EFA6 et l'endophiline				
١.	Contexte et objectif de l'étude			
١١.	Article	82		
III.	Résumé	91		
IV.	Résultats complémentaires	92		
V.	Conclusion	99		
Résultats partie 2 : Mécanismes de régulation d'EFA6103				
١.	Introduction	103		
١١.	EFA6 régule l'activation d'Arf1 et d'Arf6 par une boucle de rétrocontrôle néga	tif 106		
А	A. Introduction	106		
В	8. Résultats	106		
С	C. Article	109		
D	D. Conclusion	119		
III.	Mécanismes de régulation du facteur d'échange EFA6	121		
A	A. Introduction	121		
В	B. Matériel et méthodes	123		
С	C. Résultats	128		
D	D. Conclusion	147		
Discussion				
Conclusion générale				

# Introduction

### Introduction

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'endocytose et au rôle du facteur d'échange EFA6 (Exchange Factor for Arf6) dans ce processus. Pour cela j'ai étudié les mécanismes moléculaires qui contrôlent son interaction avec ses partenaires et en particulier des protéines impliquées dans l'endocytose. Dans la première partie de cette introduction, je commencerai par décrire les différents types d'endocytose qui permettent l'internalisation de molécules à la surface de la cellule et je me focaliserai sur l'endocytose dépendante de la clathrine. La deuxième partie de mon introduction portera sur les protéines à domaine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) et plus particulièrement l'endophiline sur laquelle j'ai travaillé pendant ma thèse. Dans une troisième partie, je m'intéresserai aux petites protéines G et je détaillerai la famille des protéines Arf (ADP-rybosylation factor) et notamment Arf6 qui est le substrat d'EFA6. Je décrirai ensuite des facteurs d'échange à domaine Sec7 et je finirai cette introduction en vous détaillant le facteur d'échange EFA6.

### I. L'endocytose

Tous les organismes pluricellulaires sont composés de cellules capables de communiquer entre elles et avec leur environnement. En effet, les cellules peuvent émettre ainsi que recevoir, interpréter et répondre aux signaux émis par leur environnement tels que les hormones, les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs. Les protéines présentes à la membrane plasmique, comme par exemple les récepteurs et les canaux ioniques, sont des acteurs importants dans cette communication et dans la régulation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Par conséquent, la régulation de la présence de ces protéines à la surface des cellules est un processus important pour le maintien de l'homéostasie fonctionnelle et structurale des cellules. Cette régulation se fait par une internalisation, appelée endocytose, et un recyclage de ces protéines membranaires. L'endocytose est un processus permettant d'introduire à l'intérieur de la cellule du matériel extracellulaire ou présent à la surface de la cellule par l'intermédiaire de vésicules dérivées de la membrane plasmique. Cette endocytose est régulée par différents mécanismes qui font intervenir des protéines adaptatrices et des manteaux protéiques distincts en fonction des molécules à internaliser. Ainsi on distingue deux grands types d'endocytose: l'endocytose indépendante de la clathrine et l'endocytose dépendante de la clathrine (Figure 1)(Mayor and Pagano, 2007).



#### Figure1 : Les différentes voies d'endocytose.

L'internalisation de molécules à l'intérieur des cellules se fait par différentes voies d'endocytose. On retrouve l'endocytose dépendante de la clathrine, l'endocytose dépendante des cavéoles, l'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles (CLIC/GEEC, flotiline, endophiline...) et l'endocytose à grande échelle (phagocytose, macropinocytose)

Au cours de ma thèse, je me suis plus principalement intéressée à la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Figure 2).

#### A. L'endocytose dépendante de la clathrine



# Figure 2: Représentation schématique de l'endocytose d'un récepteur couplé aux protéines G par la voie dépendante de la clathrine.

L'endocytose dépendante de la clathrine permet l'internalisation de certains récepteurs dont les récepteurs couplés aux protéines G. Une fois activés, ces récepteurs se concentrent au niveau de puits en formation et lient les protéines adaptatrice et la clathrine. La dynamine et la synaptojanine sont ensuite recrutées et permettent respectivement la fission de la vésicule et le désassemblage du manteau de clathrne.

#### 1. La clathrine

Les vésicules recouvertes de ce manteau ont été découvertes dans les années 1970 et leur composant majeur fut isolé par Pearse et nommé clathrine (Pearse, 1976). Les vésicules recouvertes de clathrine existent dans toutes les cellules eucaryotes, des levures aux mammifères (Mueller and Branton, 1984).

La clathrine est une protéine composée d'un trimère de chaînes lourdes chacune associée à une chaîne légère et nommé triskèle (Figure 3A) (Kirchhausen, 2000; Ungewickell and Branton, 1981). Les chaines lourdes possèdent un poids moléculaire de 190kDa et leur séquence est très conservée parmi les espèces (Keen, 1990). Elles se décomposent en 5 domaines dont un domaine N-terminal globulaire, un domaine courbé nommé «genou» qui sépare la partie distale et proximale et une extrémité C-terminale (Figure 3B) (Fotin et al., 2004). Les extrémités C-terminales de chacune des chaines lourdes se regroupent dans une région centrale pour former le triskèle. Chaque chaine lourde est en complexe, au niveau de son domaine proximal, avec une des chaines légères de 25kDa, LCa ou LCb codées par des gènes différents. Les chaines légères se décomposent en 3 domaines: un domaine conservé C-terminal séparé du domaine N-terminal par le domaine central en  $\alpha$  hélice. Les triskèles de clathrine s'associent entre eux, par l'intermédiaire des jambes proximales et distales, permettant la formation de cages nécessaires à la déformation de la membrane plasmique (Figure 3C). Ce processus est hautement dynamique et va conduire à la formation d'invagination de la membrane plasmique de forme bulbaire et possédant un diamètre compris entre 80 et 100nm (Figure 4).



Figure 3: Molécule et cage de clathrine vue en microscopie électronique (Nathke et al., 1992; Smith et al., 1998; Ungewickell and Branton, 1981).



Figure 4: Etapes de formation d'une vésicule recouverte de clathrine observées en microscopie électronique (Heuser et al., 1987; Perry and Gilbert, 1979).

#### 2. <u>Les protéines adaptatrices</u>

Les protéines adaptatrices lient les cargos destinés à être internalisés pour les concentrer au sein des vésicules. Il existe deux types majeurs de complexe adaptateur à la clathrine: les complexes hétérotétramériques de protéines adaptatrices AP et la protéine monomérique GGA (Golgi-localising, Gamma-adaptin ear domain homology, ARF-binding proteins).



La famille des AP est composée de quatre protéines différentes : AP-1, AP-2, AP-3 et AP-4.

### <u>Figure 5 : Représentation schématique des protéines adaptatrices de la famille AP</u> (adaptée de (Mattera et al., 2011)).

Les 4 isoformes de la famille AP sont composés d'une grande sous-unité  $\beta$ , d'une sous-unité variable, d'une sous unité intermédiaire  $\mu$  et d'une petite sous-unité  $\zeta$ .

La famille des AP est composée de quatre protéines différentes : AP-1, AP-2, AP-3 et AP-4. Elles sont formées des complexes hétérotétramériques d'environ 300kDa composés de deux grandes sous-unités (~100 kDa): une sous-unité  $\beta$  et une sous-unité variable ( $\gamma$  pour AP-1,  $\alpha$ pour AP-2,  $\delta$  pour AP-3 et  $\epsilon$  pour AP-4); d'une sous-unité intermédiaire  $\mu$  (~50 kDa) et d'une petite sous-unité ζ (~17 kDa) (Figure 5). L'ensemble de ces protéines possède une structure commune qui consiste en un large corps et deux charnières flexibles aboutissant à deux « oreilles » carboxy-terminale (Collins et al., 2002). Les protéines AP-1 et AP-2 sont les premières à avoir été découvertes. Elles sont toutes les deux présentes dans les puits recouverts de clathrine, au niveau du TGN (Trans-Golgi-Network) et des endosomes pour AP-1 et au niveau de la membrane plasmique pour AP-2. Les protéines AP-3 et AP-4 possèdent la même localisation que le complexe AP-1 mais ne sont pas retrouvées au niveau des puits recouverts de clathrine (Robinson and Bonifacino, 2001). Des expériences ont également mis en évidence que les protéines AP-1 et AP-2 possèdent au niveau de leurs sous unités  $\mu$  des sites de reconnaissance pour les motifs YXX $\Phi$  et NXX $\Phi$  ( $\Phi$  étant un résidu hydrophobe), présent au niveau de l'extrémité C-terminale des protéines membranaires empruntant la voie clathrine (Traub, 2009). De plus, elles possèdent également des sites de reconnaissances pour les phosphoinositides. AP-1 interagit directement avec le PI(4)P (PhosphatidylInositol-4-Phospate) (Wang et al., 2003) et AP-2 interagit lui avec le PI(4,5)P2 (PhosphatidylInositol-4,5-diPhospate) (Rohde et al., 2002). Ces protéines possèdent également au niveau de leur charnière des sites de liaison pour le domaine terminal de la chaine lourde de la clathrine. Leurs « oreilles » sont capables de lier des protéines accessoires qui vont permettre de réguler la formation du puits recouvert de clathrine, telle que l'auxiline (Owen et al., 1999).



### Figure 6 : Protéine adaptatrice AP-2 impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine (Jackson et al., 2010)).

La sous-unité  $\alpha$  est représentée en bleu, la sous-unité  $\beta$  est en vert, la sous unité  $\mu$  est en violet et la sous-unité  $\zeta$  en turquoise.

Il existe trois isoformes de GGAs chez les mammifères et deux chez les levures. Elles partagent une organisation commune. Elles sont composées au niveau N-terminal d'un domaine VHS (Vps27p, Hrs, and STAM) responsable de la reconnaissance du cargo, d'un domaine GAT (GGA and TOM1) permettant l'interaction entre les GGAs et les proteins Arfs activées, d'une région variable possédant un site de reconnaissance à la clathrine et d'un domaine homologue à « l'oreille » de la γ-adaptine au niveau C-terminal recrutant des protéines accessoires régulant l'endocytose dépendante de la clathrine. Les GGAs sont impliquées dans le transport vésiculaire du TGN vers les endosomes et les lysosomes (Bonifacino, 2004).

#### 3. La dynamine

Après la formation du puits d'endocytose recouvert du complexe AP-2/clathrine, la vésicule va devoir se dissocier de la membrane plasmique afin d'être internalisée. La première protéine à avoir été décrite comme impliquée dans le mécanisme de fission membranaire fut la dynamine (Damke et al., 1994; van der Bliek et al., 1993). La dynamine est une protéine de 100kDa possèdant une activité GTPasique. Il existe 3 gènes de cette protéine chez les mammifères Dyn1, Dyn2, et Dyn3 codant pour une multitude de variants d'épissage. La dynamine 1 est majoritairement exprimée au niveau des neurones (Ferguson et al., 2007), la dynamine 3 est retrouvée au niveau des testicules (Vaid et al., 2007) alors que la dynamine 2 est quant à elle ubiquitaire (Warnock et al., 1997). La dynamine est composée d'un domaine liant le GTP en N-terminal, un domaine PH (Pleckstrin Homology) capable de lier les phospholipides (Salim et al., 1996) et d'un domaine C-terminal. Ce dernier comporte un domaine GED (GTPase Enhancing Domain), capable de se lier au domaine N-terminal et de stimuler son activité GTPase intrinsèque (Muhlberg et al., 1997), et un domaine riche en proline (PRD) capable de lier la majorité des partenaires de la dynamine (Ringstad et al., 1997). Il existe également une dynamine impliquée dans la fission des mitochondries. Cette protéine est appelée Dnm1 (Dynamin-related 1) chez les levures (Bleazard et al., 1999) et Drp1 (Dynamin-related protein 1) chez les mammifères (Imoto et al., 1998; Shin et al., 1997; Smirnova et al., 1998). Les dynamines mitochondriales partagent la même structure à l'exception du domaine riche en proline qui est absent et du domaine PH qui est remplacé

par une séquence appelée Insert B (Figure 7A). La dynamine va se polymériser autour du cou de la vésicule et permettre, de par son activité GTPasique, la fusion des membranes et la scission de la vésicule (Figure 7B) (Morlot and Roux, 2013).



# Figure 7: Représentation schématique de l'organisation en domaine et du mode d'action de la dynamine.

La dynamine se polymérise autours du cou de la vésicule en formation et par construction permet sa libération au sein de la cellule.

Domaine G : domaine liant le GTP

PH: Pleckstrin Homology

GED: GTPase Enhancing Domain

PRD: Proline Rich Domain

#### 4. <u>La synaptojanine</u>

Les phospholipides membranaires sont des régulateurs pléiotropes de l'assemblage et du désassemblage du manteau de clathrine. De ce fait, la synaptajanine, une polyphosphoinositides phosphatase joue un rôle important dans l'endocytose dépendante de la clathrine (Cremona et al., 1999; McPherson et al., 1996). Il existe deux synaptojanines chez l'Homme, la synaptojanine 1 spécifique du cerveau et la synaptojanine 2 exprimée dans différents tissus comme le cœur, les poumons et les reins. Elles sont composées de deux domaines phosphatases distincts (McPherson et al., 1996; Rivas et al., 1999), un domaine homologue à Sac1 en N-terminal qui agit sur le PI(3)P, le PI(4)P et le PI(3,5)P<sub>2</sub> (Rivas et al., 1999) et un domaine inositol 5'-phosphatase qui agit sur le PI(4,5)P<sub>2</sub> et PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Chang-Ileto et al., 2011; Cremona et al., 1999). Elles possèdent également un domaine C-terminal dont la séquence diverge entre la synaptojanine 1 et la synaptojanine 2. Ce domaine est composé de séquences riches en Proline qui leur permettent d'interagir avec les domaines SH3 (Src Homology domain 3) de partenaires impliqués, entre autre, dans l'endocytose dépendante de la clathrine, comme l'amphyphysine (David et al., 1996) et l'endophiline (de Heuvel et al., 1997; Ringstad et al., 1997) que je détaillerai dans un prochain paragraphe. L'épissage alternatif de ce domaine donne naissance à deux isoformes pour la synaptojananine 1, une forme courte à 145KDa et une longue à 170KDa (McPherson et al., 1996) possédant une extrémité C-terminale supplémentaire qui interagit avec le complexe adaptateur AP-2 et la clathrine. Une étude a mis en évidence que l'endophiline recrute dans les étapes tardives de l'endocytose dépendante de la clathrine l'isoforme 145KDa (Milosevic et al., 2011; Perera et al., 2006) qui va permettre par déphosphorylation des phospholipides membranaires le désassemblage du manteau protéique. L'isoforme 170KDa est recruté plus précocement (Milosevic et al., 2011; Perera et al., 2006). L'arrivée de la forme longue au niveau des puits recouverts de clathrine, où elle semble jouer un rôle dans leur maturation, précède celle de l'endophiline et de la dynamine et dépend de son extrémité C-terminal.

Chez les souris KO pour la synaptojanine 1 on observe au niveau des terminaisons nerveuses une accumulation de vésicules internalisées recouvertes du manteau de clathrine, confirmant son rôle dans le désassemblage de ce manteau protéique (Cremona et al., 1999; Luthi et al., 2001). Néanmoins des études suggèrent que la synaptojanine 1 participe en collaboration avec la dynamine à l'étape de fission des vésicules (Chang-Ileto et al., 2011).

La voie d'endocytose dépendante de la clathrine est la voie la plus étudiée et la mieux comprise à l'heure actuelle. Ce phénomène est présent chez tous les eucaryotes et les protéines impliquées dans ce processus sont très conservées. Cette voie est empruntée par un grand nombre de récepteurs transmembranaires. Ces récepteurs sont subdivisés en deux catégories en fonction de leur mode d'internalisation. On distingue ceux internalisés de façon constitutive, indépendamment de la liaison d'un ligand comme le récepteur à la transferrine, et ceux internalisés de manière régulée. Ces derniers nécessitent la fixation de leur ligand pour être internalisés et sont généralement impliqués dans la transmission de signaux intracellulaires. C'est le cas de certains récepteurs couplés aux protéines G sur lesquels je me focaliserai dans ce manuscrit.

#### 5. <u>Les récepteurs couplés aux protéines G</u>

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la famille de protéines la plus grande et la plus hétérogène chez les mammifères (Fredriksson et al., 2003; Takeda et al., 2002). Ils représentent environ 1% du génome et contrôlent les grandes fonctions de l'organisme telles que la vision, l'olfaction ou encore la neurotransmission. Les RCPG sont des protéines à 7 domaines transmembranaires (Li et al., 2004; Schertler et al., 1993) qui, suite à leur stimulation, vont permettre le transfert de l'information à travers la membrane cellulaire. Ils sont activés par les photons ou par une multitude de ligands endogènes ou exogènes comme des peptides, des acides aminés, des hormones et des ions. Une fois activés, ces RCPGs vont changer de conformation, lier et activer une famille de protéines: les protéines G hétérotrimériques. Celles-ci sont composées de trois sous-unités : la sous-unité  $\alpha$ , qui se lie au GDP à l'état inactif et au GTP quand elle est activée, et les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Les protéines G hétérotrimériques, qui sont liées à l'état inactif, se dissocient en deux complexes suite à leur activation. On retrouve la sous-unité G $\alpha$  liée au GTP et les sous-unités G $\beta$ q (Figure 8). Ces deux parties modulent la concentration de messagers secondaires

intracellulaires et régulent ainsi différentes voies de signalisation afin de répondre au stimulus reçu.





Une fois activés par leurs ligands, les RCPG changent de conformation. Ceci leur permet de lier et d'activer les protéines G hétérotrimériques. Ces dernières se dissocient en une sousunité G $\alpha$  liée au GTP et les sous-unités G  $\beta$  et  $\gamma$  et activent ainsi différentes voient de signalisation.

#### 6. Les GRKs (G-protein Receptor Kinase)

Cependant l'activation et la cascade de signalisation induites par la fixation du ligand sur le récepteur ne peuvent pas perdurer dans la cellule afin d'éviter les effets néfastes d'une stimulation prolongée du récepteur. C'est pourquoi l'activité de ces récepteurs est finement régules. En effet, après stimulation, les RCPGs sont phosphorylés par des protéines kinases, les GRKs (G-protein Receptor Kinase) qui sont des protéines clés dans la désensibilisation des RCPGs. Les GRKs appartiennent à la famille des sérine/ thréonine kinase. A ce jour, 7 GRKs ont été décrites et subdivisées en 3 sous-familles en fonction de leur homologie de séquence : la famille des kinases visuelles (GRK1 et GRK7), la famille des kinases des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (GRK2 et GRK3) et la famille GRK4 (GRK4, GRK5 et GRK6).



#### Figure 9: Organisation de la structure en domaines des GRKs (G-protein Receptor Kinase)

#### (adapté de (Sato et al., 2015)).

Domaine RH: Regulator of G-protein signaling (RGS) Homology domain

Domaine PH: Pleckstrin Homology

GRK	Expression	GPCRs Ciblés	
1	Rétine	Rhodopsine	
2	Ubiquitaire, cœur	Récepteurs β-adrénergiques,	
		angiotensine II type 1	
3	Ubiquitaire,	Récepteur α1-adrénergique,	
	épilthélium olfactif	Thrombine, récepteurs	
		muscariniques M2 et M3	
4	Testicules, rein, cerveau	Dopamine 1	
5	Ubiquitaire, cœur	Récepteurs β-adrénergiques,	
		angiotensine II type 1,	
		récepteur muscarinique M2	
6	Ubiquitaire	Récepteurs aux chimiokines	
		4, dopamine 2	
7	Rétine	Opsines	

# Tableau 1 : classification des GRKs exprimées chez les mammifères (adapté de (Belmonte and Blaxall, 2011)).

Ces kinases sont exprimées de manières ubiquitaires à l'exception de GRK1 et GRK7, exprimées au niveau de la rétine, et de GRK4 localisée dans les testicules (Tableau 1). Les GRKs partagent une architecture commune. Elles sont composées d'un domaine central catalytique entouré d'un domaine N-terminal et d'un domaine C-terminal de taille variable. Le domaine N-terminal est très conservé et semble être important pour la reconnaissance du substrat (Garcia-Higuera et al., 1994; Murga et al., 1996). Il possède un domaine d'homologie aux protéines régulatrices de la signalisation des protéines G, nommé domaine RH (Regulator of G-protein signaling (RGS) Homology domain) (Carman et al., 1999; Dhami et al., 2002; Sallese et al., 2000). Le domaine C-terminal est la région la plus divergente dans la famille des GRK et contribue à leur localisation sub-cellulaire et à leur translocation dépendante de l'agoniste à la membrane plasmique (Kohout and Lefkowitz, 2003; Pitcher et al., 1992; Reiter and Lefkowitz, 2006). En effet le domaine C-terminal des protéines GRK2 et 3 est composé d'un domaine PH capable d'interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique et un site de reconnaissance pour la sous-unité Gβγ (Figure 9) (Koch et al., 1993). Les RCPGs, suite à leur activation, sont phosphorylés sur des résidus sérine et thréonine présents dans la queue cytoplasmique ou de la troisième boucle intracellulaire des récepteurs. Cette phosphorylation va permettre d'augmenter l'affinité des RCPGs pour les arrestines et ainsi permettre la liaison de cette dernière.

#### 7. Les arrestines

Les arrestines agissent comme des cofacteurs des GRKs pour désensibiliser les RCPGs. La famille des arrestines est composée de 4 protéines cytosoliques. On retrouve ainsi deux arrestines visuelles exprimées dans la rétine, la V-arrestine et l'arrestine-C exprimées respectivement au niveau des cellules en bâtonnets et en cônes. A celles-ci s'ajoutent deux arrestines exprimées de manière ubiquitaire, la  $\beta$ -arrestine1 (ou arrestine2) et la  $\beta$ -arrestine 2 (ou arrestine3). Les  $\beta$ -arrestines sont composées de deux domaines majeurs, le domaine N et le domaine C auxquels s'ajoute un cœur polaire stabilisé par une queue carboxy-terminale qui bloque la molécule dans sa conformation inactive (Figure 10) (Moore et al., 2007; Shilton et al., 2002). En se liant à l'extrémité C-terminale des RCPGs, elles permettent, par compétition, le découplage du récepteur et des protéines G et par conséquent terminent le signal de transduction induit par la liaison du ligand. Après avoir découplé le récepteur des protéines G, les β-arrestines dirigent ensuite les RCPGs vers la machinerie d'endocytose dépendante de la clathrine. En effet, la liaison des β-arrestines aux récepteurs semble libérer leur extrémité C-terminale qui va leur permettre d'interagir avec la chaine lourde de la clathrine ainsi que la protéine adaptatrice AP-2 (Figure 11) (Moore et al., 2007; Shilton et al., 2002).



# Figure 10: Représentation schématique de la structure 3D de la β-arrestine bovine dans sa configuration inactive (Han et al., 2001).

Les couleurs varient du bleu au niveau du domaine N-terminal au rouge au niveau du domaine C-terminal.



#### Figure 11 : Modèle d'activation de la $\beta$ -arrestine après liaison au RCPG activé.

Les RCPGs activés sont phosphorylés par les protéines kinases GRK permettant ainsi le recrutement et la liaison de la  $\beta$ -arrestine aux récepteurs. La  $\beta$ -arrestine activée se change de conformation et libère ses sites de liaison pour la protéine adaptatrice AP-2 et la clathrine.

#### B. L'endocytose dépendante des cavéoles

L'endocytose indépendante de la clathrine a initialement été décrite comme étant le processus utilisé par les toxines bactériennes pour pénétrer les cellules. Au cours de ces dernières années les études sur cette voie d'internalisation se sont multipliées. Il existe plusieurs types d'endocytose indépendante de la clathrine qui sont soit constitutifs, soit déclenchés par un signal spécifique, soit détournés par des pathogènes.

La voie cavéole représente la voie d'endocytose indépendante de la clathrine la mieux étudiée. Elle fut décrite pour la première fois en 1953 par George E. Palade (Palade, 1953). Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique, en forme d'oméga et recouvertes de structures striées ou en spirale (Figure 12). Leur morphologie particulière leur permet de se distinguer facilement des puits recouverts de clathrine. Elles sont abondantes dans de nombreuses cellules eucaryotes et en particulier dans les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules musculaires et les adipocytes (Nassoy and Lamaze, 2012). Les vésicules formées ont une taille comprise entre 50 et 80nm de diamètre (Parton and Simons, 2007). Les cavéoles sont caractérisées par leur association avec une famille de protéine liant le cholestérol, les cavéolines (Rothberg et al., 1992) qui permettent en association avec une famille de protéines, les cavines, la mise en place et le maintien de ces structures. Il existe 3 isoformes de la protéine cavéoline codés par 3 gènes différents CAV-1, CAV-2 exprimées dans tous les tissus à l'exception du muscle squelettique et CAV-3 exprimé majoritairement au niveau du muscle strié (Parton and del Pozo, 2013). Les cavéolines sont composées d'un domaine C-terminal cytosolique, de deux domaines d'attachement aux membranes entrecoupés d'un domaine transmembranaire d'un et domaine d'oligomérisation (Cohen et al., 2004) (Figure 13). Les cavéoles sont composées de 140 à 150 cavéolines 1 qui ont été décrites comme étant nécessaires et suffisantes à la formation de ces structures. Les cavéolines 1 et 2 vont s'associer entre-elles au niveau de l'appareil de Golgi pour former un microdomaine plat qui va ensuite migrer vers la membrane plasmique.

C'est alors que les cavines vont intervenir. Il existe 4 isoformes des cavines chez les mammifères, la cavine 1 qui comme la cavéoline 1 est essentielle à la formation de toutes les cavéoles, la cavine 2 et la cavine 3 enrcichies au niveau des poumons et du tissus adipeux et la cavine 4 qui est spécifique du muscle (Echarri and Del Pozo, 2015). Le microdomaine des cavéolines va alors s'associer avec la cavine 1 pour former un complexe qui est essentiel

22

pour la formation des cavéoles. La cavine 1 va ensuite interagir soit avec la cavine 2 soit avec la cavine 3 en fonction du tissu dans lequel les cavéoles sont formées.

La formation et la morphologie de ces structures sont également contrôlées par la Pacsin2 une protéine à domaine F-BAR (Fer-cyp4 Homology) capable de lier et de déformer les membranes (Hansen et al., 2011). Des études ont mis en évidence que la Pacsin2 est capable d'interagir avec la cavéoline 1 et que la perte d'expression de la Pacsin2 dans les cellules entrainait une diminution de la densité des cavéoles. La Pacsin2 semble intervenir au niveau de la membrane plasmique dans le processus par lequel les microdomaines de cavéolines vont atteindre cette morphologie caractéristique des cavéoles. Le cholestérol, lui, joue un rôle dans la formation de ces cavéoles en contrôlant la transcription de la cavéoline 1 (Bist et al., 1997; Fielding et al., 1997). La fission des vésicules formées par les cavéoles se fait par l'intermédiaire de la dynamine.

Cependant, le mécanisme précis par lequel les cavéolines s'associent entre elles et avec les autres partenaires pour former la structure caractéristique des cavéoles n'est pas entièrement compris. De plus, la voie des cavéoles ne possède pas de cargos spécifiques ce qui rend son étude compliquée.

Des études récentes ont montré que les cavéoles, en plus de leur rôle dans l'endocytose, sont importantes pour la régulation de différentes voies de signalisation, pour l'homéostasie des lipides (Okamoto et al., 1998) et le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique au cours de stress mécaniques. Des expériences ont mis en évidence que la perte d'expression par knockout des différentes protéines impliquées dans cette voie, et notamment celle de la cavéoline 1, entrainait une insulino-résistance et des défauts de signalisation de l'insuline chez les souris (Cohen et al., 2003). On constate également des problèmes de vascularisation en absence de cavéoles, compliquant les études visant à déterminer le mécanisme à l'origine de ce phénotype insulino-résistant. Des mutations de la cavéoline 1 ont été décrites chez l'homme. On constate chez ces sujets, de manière similaire aux souris, une lipodystrophie et une insulino-résistance (Garg and Agarwal, 2008; Hayashi et al., 2009; Liu et al., 2008). Par ailleurs, les sujets possédant une mutation de la cavien 1, qui participe notamment à la formation des cavéoles au niveau du muscle cardiaque, développent entre autres des myopathies et des arythmies cardiaques (Ardissone et al., 2013).

Des expériences de microscopie électronique ont mis en évidence que les cavéoles se retrouvent associées aux fibres de stress composées d'actine dans différentes lignées

23

cellulaires (Rothberg et al., 1992; Valentich et al., 1997) et que ce phénomène se faisait probablement par l'intermédiaire de la filamine A (Stahlhut and van Deurs, 2000; Sverdlov et al., 2009), un « cross-linker » de l'actine. Les forces mécaniques activent entre autres, au sein de la cellule, les protéines RhoA (Ras homolog gene family A), Erk (Extracellular signalregulated kinases), Akt et Enos (Endothelial Nitric Oxide Synthase) et les cavéoles ont été décrites comme jouant un rôle dans ce processus d'activation (Grande-Garcia et al., 2007). Les protéines Cavine 1 et Cavine 4 sont capables de réguler positivement RhoA qui est un acteur majeur dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et le contrôle de la contractilité de l'actomyosine. Des expériences ont également mis en évidence que le désassemblage des cavéoles permettait aux cellules de répondre au stress mécanique (Sinha et al., 2011). L'exposition des cellules à un stress mécanique aigue entraine un désassemblage des cavéoles, une diminution de l'interaction entre les cavéolines et les cavines et une augmentation de la quantité de cavéolines libres à la membrane plasmique.



Figure 12: Structure des cavéoles (Shaul and Anderson, 1998).



Figure 13: Représentation schématique des cavéolines (adaptée de (Cohen et al., 2004).

La cavéoline est composée de différents domaines dont un transmenbrannaire et un domaine lui permettant de s'oligomériser.
#### C. L'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles

En plus de l'endocytose dépendante des cavéoles, d'autres voies d'internalisation clathrine indépendantes mais nécessitant l'action de la dynamine ont également été décrites. Ainsi, des études ont mis en évidence que le récepteur à l'interleukine-2 (IL-2) s'internalise par l'intermédiaire de petites invaginations de membranes non recouvertes de manteau (Lamaze et al., 2001; Sauvonnet et al., 2005; Subtil et al., 1994). Cette voie est dépendante du cholestérol et on retrouve ces invaginations au niveau de radeaux lipidiques (Lamaze et al., 2001). Ces vésicules possèdent une taille (50 à 100nm) et une concentration de récepteurs conservées, sous-entendant l'implication de protéines encore non identifiées dans le recrutement de ces récepteurs au niveau du site d'endocytose. Cette voie semble être également dépendante de la polymérisation de l'actine et des protéines RhoA et Rac1 (Grassart et al., 2008; Lamaze et al., 2001; Sauvonnet et al., 2005). Le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) a été décrit comme étant endocyté de manière clathrine dépendante. Néanmoins, il semblerait qu'en présence de concentration élevée d'EGF, ce récepteur emprunte également d'autres voies d'internalisation indépendantes de la clathrine et des cavéoles (Lund et al., 1990; Sigismund et al., 2005).

D'autres voies indépendantes de la clathrine ont également été décrites dont la voie flotiline qui permet l'internalisation de phase fluide, de différentes protéines dont CD59 (Ait-Slimane et al., 2009) et également des protéoglycanes (Payne et al., 2007).

On retrouve également la voie CLIC/GEEC (Clathrin Independant Carrier/ GPI-AP (GlycosylPhosphatidylInositol Anchored Proteins) enriched Early Endosomal Compartments). Cette voie permet, par l'intermédiaire de protrusion en forme de tubules, l'internalisation de protéines possédant une ancre GPI. Elle est dépendante du cholestérol et de sphingolipides (Chadda et al., 2007; Sharma et al., 2004) mais n'est pas associée à un manteau protéique (Kirkham et al., 2005). Des études ont également montré que l'actine est un acteur majeur de la régulation de cette voie initiée par le recrutement de GBF1 (Golgi-specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1) (Gupta et al., 2009), un facteur d'échange pour les petites protéines G de la famille Arf, qui va permettre par l'intermédiaire d'une voie de signalisation en aval d'Arf1 le recrutement de la machinerie de polymérisation de l'actine. Arf1 activé par GBF1 va recruter la protéine ARHGAP10 (Rho GTPase Activating Protein 10) à

la membrane plasmique (Kumari and Mayor, 2008) qui va réguler l'activité de la protéine Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) et permettre le recrutement de la protéine WASP (Wiskott–Aldrich Syndrome Protein) permettant la polymérisation de l'actine (Chadda et al., 2007). Il a également été mis en évidence le rôle d'une protéine à domaine BAR dans ce processus. La protéine GRAF1 (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1) se trouve colocalisée avec les cargos de cette voie dans des cellules Hela (Lundmark et al., 2008). De plus, par une approche de siRNA, il a été mis en évidence que la diminution d'expression de GRAF1 dans les cellules perturbait cette internalisation. Néanmoins son rôle précis n'est pas encore défini. GRAF1 pourrait agir en contrôlant l'activité de Cdc42 par l'intermédiaire de son domaine RhoGAP, mais pourrait également participer à la déformation de la membrane grâce à son domaine BAR (Figure 14).



Figure 14: Représentation schématique de l'endocytose par la voie CLIC/GEEK (adaptée de

## Boisvert and Tijssen, 2012).

La voie d'endocytose CLIC/GEEK fait intervenir des petites protéines G Arf1 et Cdc42 qui permettent le recrutement de la machinerie de polymérisation de l'actine et la protéine à domaine BAR GRAF1 qui pourrait participer à la déformation de la membrane plasmique.

## D. L'endocytose à grande échelle

Il existe également des voies d'endocytose à grande échelle qui permettent l'internalisation de molécules de grandes tailles dans des vésicules pouvant aller jusqu'à 2µm de diamètre. Ces voies regroupent la macropinocytose et la phagocytose. La macropinocytose est provoquée par la formation de protrusions membranaires qui vont fusionner pour former de grandes vésicules irrégulières, appelées macropinosomes (Johannes and Lamaze, 2002). Les macropinosomes sont des structures dynamiques qui permettent l'internalisation de molécules de grandes tailles comme par exemple des bactéries. La phagocytose, quant à elle, est utilisée par des cellules spécialisées comme les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Elle permet également l'internalisation de grosses molécules comme des bactéries ou des cellules à l'intérieur des phagosomes, médiée par différents récépteurs. Elle s'effectue à partir de pseudopodes qui vont s'étendre autour du corps étranger et l'englober (Flannagan et al., 2012). Les petites protéines G de la famille Rho, en régulant la machinerie de polymérisation de l'actine (Beemiller et al., 2010; Higgs and Pollard, 2000; Innocenti et al., 2005), jouent un rôle majeur dans ces deux processus. Par différentes voies de signalisation, les récepteurs à la surface des cellules vont permettre l'activation des protéines Rho, Rac et Cdc42. Ces dernières vont pouvoir ainsi recruter le complexe Arp2/3 qui va permettre le branchement de filaments d'actine au niveau du complexe de phagocytose (Figure 15).



Figure 15: Représentation schématique d'une voie d'endocytose à grande échelle : la phagocytose.

Les petites protéines G de la famille Rho joue un rôle dans le processus de phagocytose en régulant la machinerie de polymérisation de l'actine. Ceci permet l'internalisation de grosses molécules par l'intermédiaire de pseudopodes qui vont s'étendre autours du corps étranger pour l'englober.

## II. Les protéines à domaine BAR

Les cellules eucaryotes sont caractérisées par une multitude de processus physiologiques impliquant la déformation de membrane, comme par exemple l'endocytose, l'exocytose, l'angiogenèse ou la migration cellulaire. Dans la majorité des cas le remodelage dynamique de la membrane nécessite l'association réversible de protéines possédant des capacités de déformation et notamment des protéines de la superfamille à domaine BAR.

## A. Structure

Le domaine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) a été identifié comme étant un domaine très conservé, partagé par les protéines de levure Rvs161 et Rvs167 (Reduced viability after starvation) et les protéines de mammifères Amphiphysin et Bin (bridging interactor) (David et al., 1994). Il est composés de 3 hélices  $\alpha$  en coiled-coil qui se dimérisent (Peter et al., 2004) et forment ainsi une surface chargée positivement qui va être capable d'interagir avec les phospholipides chargés négativement des membranes cellulaires. Ils sont généralement trouvés associés à un second site de liaison aux phospholipides comme une hélice  $\alpha$  amphypatique, à un domaine PH ou un domaine PX (Phox homology domain) (Figure 16) (Safari and Suetsugu, 2012). Bien qu'il n'existe pas un motif de séquence caractéristique, au niveau structural les domaines BAR sont assez bien conservés. Ils possèdent une géométrie caractéristique en forme de «banane» leur permettant de sentir les courbures et/ou de déformer les membranes. Il existe 3 types différents de domaines BAR (Fer-cyp4 Homology) et les domaines I-BAR (inverted) (Figure 17) (Frost et al., 2009; Qualmann et al., 2011).



Figure 16: Schéma de la structure 3D des différents domaines BAR (Henne et al., 2007).



Figure 17 : Schéma de la structure en domaines de différentes protéines à domaine BAR (adapté de (Safari and Suetsugu, 2012)).

SH3: Src Homology domain 3

PX: Phox homology domain

PH: Pleckstrin Homology domain

PTB: PhosphoTyrosine Binding

PDZ: PSD95/Dlg1/Zo-1

Ank: Ankyrin repeats

#### B. Fonctions

Les protéines à domaine BAR possèdent également des domaines d'interaction protéineprotéine, permettant l'association à différents partenaires nécessaires à leur fonction. Ainsi de nombreuses protéines à domaine BAR sont capables d'interagir via leur domaine SH3 avec des protéines possédant des domaines riches en Proline, comme notamment les protéines N-WASP (Neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein), WASH (Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homologe) et WAVE (Wasp family Verprolin homologous protein) impliquées dans la polymérisation de l'actine (McMahon and Gallop, 2005). Les protéines à domaine BAR sont des régulateurs de la déformation de la membrane, intervenant aussi bien dans la formation d'invaginations que de protrusions. De nombreuses études ont mis en évidence que l'endophiline (Itoh and De Camilli, 2006; Peter et al., 2004) et la syndaptine (Wang et al., 2009), possédant respectivement des domaines N-BAR et F-BAR, induisent la formation de tubules sur des liposomes. Les domaines I-BAR permettent la formation de filopodes. La protéine IPSp53, suite à son interaction avec Cdc42, est recrutée à la membrane plasmique et induit, grâce à sa courbure convexe et au recrutement des facteurs de polymérisation de l'actine, la formation des filopodes (Ahmed et al., 2010).

De nombreuses protéines à domaine BAR sont impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine. En effet, des études ont mis en évidence le rôle de ces protéines à différentes étapes de la formation de la vésicule. Ainsi la protéine FCHO (Fer/Cip4 Homology domain-Only) semble impliquée dans les étapes précoces de la formation de la vésicule en s'associant au PIP2 et initiant la déformation de la membrane par l'intermédiaire de son domaine F-BAR (McMahon and Boucrot, 2011). Les protéines à domaine N-BAR amphiphysine, SNX9 (Sorting Nexin 9) et endophiline interviennent également dans ce processus de déformation membranaire mais aussi dans les étapes tardives en permettant le recrutement de la dynamine nécessaire à la fission de la vésicule.

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à l'endophiline.



Figure 18: Représentation schématique de l'interaction entre le domaine NBAR de l'endophiline et les phospholipides membranaires (Gallop et al., 2006).



Figure 19: Organisation en domaines des différents isoformes de l'endophiline (adapté de

(Takahashi et al., 2009).

Domaine SH3: Src Homology domain 3

## C. L'endophiline

#### 1. <u>Généralités</u>

L'endophiline est une protéine exprimée de manière ubiquitaire, mais est particulièrement abondante au niveau du cerveau. Il existe deux sous-familles d'endophiline: l'endophiline A composée de l'endophiline A1, A2 et A3 codées par différents gènes; et l'endophiline B qui regroupe les endophilines B1 et B2 également codées par différents gènes (Kjaerulff et al., 2011). L'endophiline possède trois domaines dont un domaine N-BAR lui permettant de se dimériser et de lier les phospholipides membranaires (Figure 18). Elle possède également un domaine intermédiaire de fonction inconnue et un domaine SH3 lui permettant d'interagir avec des domaines riches en proline (Figure 19).

#### 2. <u>L'endophiline dans l'endocytose dépendante de la clathrine.</u>

Les endophilines sont impliquées dans l'internalisation de différents récepteurs, le recyclage des vésicules synaptiques, et différents processus nécessitant le remodelage de la membrane plasmique. Les endophilines ont initialement été étudiées pour leur implication dans l'endocytose clathrine dépendante. Elles semblent être impliquées dans de multiples étapes de ce processus, précocement, mais également à des étapes plus tardives. En effet, il a été montré que l'injection d'anticorps dirigés contre l'endophiline dans des synapses bloquait l'invagination des puits recouverts de clathrine (Ringstad et al., 1999). Ceci a pour conséquence une accumulation de puits recouverts de clathrine peu profonds au niveau pré-synaptique et un blocage du recyclage des vésicules synaptiques. D'autre part, les mêmes résultats ont été obtenus par l'injection d'un peptide capable de lier le domaine SH3 de l'endophiline ou du domaine SH3 lui même dans des synapses (Gad et al., 2000). Ces résultats suggèrent que l'endophiline participe aux étapes de scission des vésicules, mais joue également un rôle majeur dans le désassemblage du manteau AP-2/clathrine et dans le recyclage. La leucine 215, présente au niveau de la troisième hélice  $\alpha$ , a été montrée comme étant importante pour la dimérisation de l'endophiline (Gortat et al., 2012). La mutation de ce résidu en asparagine altère la capacité de la protéine à lier ses partenaires via son domaine SH3 et affecte l'internalisation de la transferrine. Une étude a également montré que contrairement aux endophiline A1 et A2 qui possèdent une hélice  $\alpha$  au niveau de leur région intermédiaire, l'endophiline A3 possède un feuillet  $\beta$  lui conférant une propriété inhibitrice sur l'internalisation du récepteur à la transferrine et du récepteur à la dopamine D2 (Sugiura et al., 2004). Des expériences dans la souris ont mis en évidence que le KO des 3 endophilines A aboutit à une létalité périnatale et une forte accumulation de puits recouverts de clathrine au niveau des synapses (Milosevic et al., 2011). En revanche, le double KO des endophilines 1 et 2 semble être compatible avec une viabilité post-natale, mais entraîne une neuro-dégénérescence aboutissant à la mort des souris au bout de 3 semaines. Ces résultats indiquent que les différentes endophilines possèdent au moins partiellement des rôles redondants et que leur fonction devient essentielle uniquement après la naissance.

Les endophilines sont capables, par l'intermédiaire de leur domaine SH3, d'interagir et de recruter au niveau des puits en formation deux protéines majeures dans l'endocytose : la dynamine et la synaptojanine (Micheva et al., 1997; Ringstad et al., 1999; Sundborger et al., 2011). La dynamine est impliquée dans l'étape de fission de la vésicule alors que la synaptojanine va permettre le désassemblage du manteau sur la vésicule internalisée (Figure 20).



#### Figure 20 : Rôle de l'endophiline dans l'endocytose dépendante de la clathrine.

L'endophiline, grâce à son domaine N-BAR qui reconnait la courbure membranaire, est présente au niveau des puits en formation et recrute la dynamine et la synaptojanine. Ces dernières participent respectivement à la fission de la vésicule et au désassemblage du manteau de clathrine.

Bien que des expériences en microscopie électronique et à fluorescence ont mis en évidence la présence d'endophiline au niveau des puits de clathrine, l'endophiline ne semble être présente qu'au niveau d'un quart de ces structures (Perera et al., 2006; Taylor et al., 2011). Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que l'endophiline intervient majoritairement dans les étapes tardives de l'endocytose dépendante de la clathrine et de ce fait est recrutée qu'au niveau des puits matures qui représentent qu'une fraction de ces structures. De plus, l'internalisation de certains récepteurs, comme le récepteur à la transferrine, n'est pas affectée par la déplétion des trois isoformes de l'endophiline A (Meinecke et al., 2013).

## 3. Voie d'endocytose dépendante de l'endophiline

Des études récentes suggèrent que l'endophiline contrôle une voie d'internalisation indépendante de la clathrine nommée FEME (Fast Endophilin Mediated Endocytosis) (Boucrot et al., 2015). Cette voie est définie par une formation rapide de vésicules tubulaires, recouvertes d'endophiline, qui sont internalisées suite à la stimulation des cargos à internaliser par leurs ligands. D'après des expériences réalisées sur des cellules dont l'expression des trois endophilines A a été réprimée, cette voie permettrait l'internalisation de RCPGs comme le récepteur  $\beta$ 1- adrénergique, de récepteurs à activité tyrosine kinase comme le récepteur à l'EGF en présence d'une concentration élevée en EGF et du récepteur à l'IL-2 (Boucrot et al., 2015). Elle serait également empruntée par la toxine du choléra et la shiga toxine (Renard et al., 2015). L'endophiline A2 est recrutée à la membrane plasmique pour former des structures appelées EPAs (Endophilin Positive Assembies). Le recrutement des endophilines à la membrane plasmique se ferait par l'intermédiaire de la lamellipodine. La lamellipodine est recrutée à la membrane plasmique par son interaction via son domaine PH avec le PIP2, et ce mécanisme est dépendant de la PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) de classe 1 et des protéines SHIP1 et 2 (Src homology 2 domain-containing inositol-5phosphatase 1) qui vont déphosphoryler le PIP3. Une fois à la membrane plasmique, l'endophiline via son domaine SH3 va pouvoir interagir avec les cargos à internaliser. Des expériences ont mis en évidence que l'endophiline était capable de lier directement un motif riche en proline présent au niveau de la troisième boucle intracellulaire du récepteur  $\beta$ 1adrénergique. Elle est également capable de lier le récepteur à l'EGF et à l'HGF (Hepatocyte Growth Factor) via les protéines CIN85 (Cbl INteracting protein 85 kDa) et Cbl (Casitas Blineage Lymphoma) dont la déplétion affecte la formation des EPAs (Boucrot et al., 2015). Par l'intermédiaire de son domaine N-BAR, l'endophiline est également capable de déformer les membranes et d'induire la formation de tubules. L'endophiline participe également aux étapes de scission des tubules formés par insertion de ces multiples hélices amphipatiques au sein de la membrane et en association avec l'actine et la dynamine. En résumé, l'endophiline possède l'ensemble des caractéristiques nécessaires à l'endocytose allant de l'interaction avec le cargo à la déformation de la membrane et la scission de la vésicule.

## 4. Endophiline et pathologies

L'implication de l'endophiline dans ces différents processus physiologiques fait d'elle une protéine importante pour le bon fonctionnement cellulaire et notamment au niveau des neurones. Ainsi, les endophilines régulent et sont régulées par différentes protéines et notamment des acteurs de la maladie de Parkinson. En effet, des études ont montré que le niveau d'expression de la E3 ubiquitine ligase Parkine est augmenté dans le système nerveux de souris TKO pour les endophilines A (Cao et al., 2014). Il a également été mis en évidence que la kinase Cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5), qui est impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives , phosphoryle l'endophiline B1 (Wong et al., 2011). Cette phosphorylation de l'endophiline est importante pour l'induction de l'autophagie et la perte neuronale dans un modèle de maladie de Parkinson. Ces résultats mettent en évidence un rôle de Cdk5 et de l'endophiline dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson en modulant l'autophagie.

L'endophiline a également été impliquée dans différents cancers. Une étude récente a mis en évidence que l'endophiline A2 est surexprimée dans plusieurs lignées cellulaires mammaires cancéreuses triple négatives (Baldassarre et al., 2015), qui n'expriment pas les recpeteurs aux œstrogènes, à la progestérone et HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2) . De plus cette surexpression de l'endophiline est corrélée à un mauvais pronostique chez les patientes. Par des approches de knockdown, il a pu être observé que l'endophiline A2 joue un rôle dans la motilité cellulaire, l'invasion et le développement de métastases.

#### 5. <u>Régulation de l'endophiline</u>

Plusieurs études ont mis en évidence que l'activité de l'endophiline était régulée par différentes modifications post-traductionnelles. La protéine MNSF $\beta$  (monoclonal nonspecific suppressor factor  $\beta$ ) qui est un membre de la famille « ubiquitine-like », vient par l'intermédiaire de la Glycine 74 présente au niveau de son extrémité C-terminale, se greffer covalement sur la Lysine 294 de l'endophiline A2 (Nakamura and Shimosaki, 2009). Il a été

mis en évidence que cette modification post-traductionnelle de l'endophiline inhibe la phagocytose des macrophages. Par ailleurs la phosphorylation des endophilines joue un rôle sur leurs fonctions. Une phosphorylation de l'endophiline A1 au niveau de la thréonine 14 présente dans l'hélice amphipatique N-terminale par la Rho kinase inhibe son interaction avec la protéine CIN85 et entraîne une inhibition de l'internalisation du récepteur à l'EGF (Kaneko et al., 2005). L'endophiline A1 est aussi phosphorylée par la protéine LRRK2 (Leucine Rich Repeat Kinase 2) au niveau de la Sérine 75 présente dans le domaine N-BAR (Matta et al., 2012), diminuant son affinité pour les membranes in vivo et in vitro ainsi que sa capacité de tubularisation. La phosphorylation de la Tyrosine 315 présente au niveau du domaine SH3 de l'endophiline A2 par le complexe FAK (Focal Adhesion Kinase)/Src entraine une diminution de l'interaction entre l'endophiline et la dynamine et une accumulation à la membrane plasmique des MMPs (matrix metalloproteinases) qui sont des protéines clés dans l'invasion tumorale (Wu et al., 2005). Cette inhibition d'internalisation des MMPs a pour conséquence une augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire.

L'endophiline est donc une protéine majeure pour le maintien de l'homéostasie cellulaire de part son rôle dans les différentes voies d'endocytose, dans le recyclage. Néanmoins, il demeure des zones d'ombres sur sa fonction et sur son mode de recrutement au niveau de la membrane plasmique.

## III. Les petites protéines G

## A. Généralités

La super-famille des protéines Ras représente un des plus grands groupes de protéines et est retrouvée de la levure aux mammifères. Cette famille de protéines est très hétérogène et plus d'une centaine de protéines sont retrouvées chez l'Homme. Les protéines de la superfamille Ras sont des protéines monomériques ayant un poids moléculaire compris entre 20 et 40 KDa. Les membres de cette super-famille sont subdivisés en fonction de leur similarité de structure et de fonction en cinq familles : les familles Ras, Rho, Ran, Arf/Sar et Rab (Takai et al., 2001). Ces protéines agissent comme des interrupteurs moléculaires qui régulent une multitude de processus cellulaires fondamentaux. Elles jouent un rôle important dans la différenciation et prolifération cellulaire, la réorganisation du cytosquelette d'actine et le trafic vésiculaire (Wennerberg et al., 2005). Découvertes dans les années 1980, elles appartiennent à une classe de protéine appelée petite protéine G car elles sont capables de lier des nucléotides guanyliques. Elles cyclent entre un état dit inactif sous forme GDP et un état dit actif sous forme GTP. Bien qu'elles possèdent intrinsèquement des activités d'échange nucléotidique et, à l'exception des protéines Arf, d'hydrolyse du GTP, celles-ci restent trop faibles pour permettre aux protéines de cycler rapidement. Ces activités intrinsèques sont catalysées et régulées par des protéines GEF (Guanines nucléotides Exchanges Factor) et GAP (GTPase Activating Protein) (Bos et al., 2007; Cherfils and Zeghouf, 2013). Les protéines GEF permettent l'activation des petites protéines G en favorisant l'échange du GDP par du GTP. Les protéines GAP quant à elles catalysent l'hydrolyse du troisième phosphate du GTP ce qui entraîne le retour sous la forme GDP et l'inactivation des petites protéines G (Figure 21).



## Figure 21 : Cycle d'activation et d'inactivation des petites protéines G.

Les petites protéines G cyclent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. Leur activation est catalysée par un facteur d'échange (GEF) et leur retour à l'état inactif se fait par une hydrolyse du 3<sup>e</sup> phosphate du GTP catalysée par une protéine GAP. Sous leur état inactif certaines petites protéines G peuvent lier des protéines GDI qui inhibent leur échange nucléotidique.

- G GTP: petite protéine G liée au GTP
- G GDP: petite protéine G liée au GDP
- GAP: GTPase Activating Protein
- GDI: GDP Dissociation Inhibitor
- GEF: Guanines nucléotides Exchanges Factor

Les membres des familles Rho, Ran et Rab sont aussi régulées par des protéines GDI (GDP Dissociation Inhibitor) (Cherfils and Zeghouf, 2013). Les GDI, en se fixant à la forme GDP, inhibent l'échange nucléotidique et maintiennent les protéines dans un état « inactif ». En passant de la forme GDP à la forme GTP, les petites protéines G changent de conformation. Cette différence de conformation permet généralement à ces protéines d'interagir avec leurs effecteurs permettant ainsi la transduction du signal. Cela peut induire également leur recrutement au niveau des membranes ou leur relocalisation à des sites spécifiques. Des études de cristallographie et de résonnance magnétique nucléaire de différentes petites protéines G ont mis en évidence une topologie commune. Elles sont composées du domaine G qui est le corps central et de régions variables, les switch 1 et 2. Les switchs 1 et 2 constituent des domaines flexibles de la protéine qui vont changer de conformation au cours du cycle GDP/GTP (Vetter and Wittinghofer, 2001) et sont impliqués dans la plupart des interactions que les petites protéines G établissent avec leurs partenaires cellulaires.

Une comparaison de la séquence de ces protéines a révélé un taux de similitude dans leur séquence primaire de 30-55%. Les protéines de cette super-famille possèdent des séquences consensus d'acides aminés responsables de l'interaction spécifique avec les nucléotides GDP et GTP mais également de l'activité GTPase (Bourne et al., 1991; Samatar and Poulikakos). De manière générale, ces petites protéines G subissent des modifications lipidiques post-traductionnelles. En effet les protéines de la famille Ras, Rho et Rab possèdent à leur extrémité C-terminale des séquences de reconnaissance à la farnésyl transférase et/ou la géranyl-géranyl transférase. La modification de la famille Arf se fait au niveau N-Terminal par une myristoylation. Ces modifications vont permettre aux protéines de s'associer aux phospholipides des membranes. Bien que certaines proteines G ne semblent pas subir de modifications lipidiques, comme c'est le cas pour Sar1, elles sont tout de même capables de s'associer aux membranes, notamment par l'intermédiaire de leur hélice amphipatique en N-terminal de façon co-traductionnelle. En revanche la protéine Ran ne subit aucune modification et n'est pas capable d'interagir avec les membranes (Tableau 2).

Famille	Fonctions	Modifications lipidiques
Ras	Différenciation et prolifération	Farnésyl
	cellulaire	Géranylgéranyl
		palmitate
Rho	Organisation du cytosquelette et	Farnésyl
	expression des gènes	Géranylgéranyl
Rab	Reconnaissance et fusion vésiculaire	Géranylgéranyl
Ran	Transport nucléo-cytoplasmique et	aucune
	cycle cellulaire	
Arf	Trafic vésiculaire	myristate

## Tableau 2 : classification des petites protéines G.

## B. La famille Ras

La protéine Ras a été la première de la super-famille des petites protéines G à être identifiée. Sa découverte dans les années 1980 s'est faite par homologie avec le gène du sarcoma virus de rat. Cette famille est composée de 35 membres qui participent à différentes voies de signalisation telles que la prolifération, la morphologie cellulaire, l'apoptose, l'expression génique et la différenciation (Reuther and Der, 2000). De nombreuses études ont mis en évidence qu'en se liant et en activant un de ses effecteurs, la protéine kinase Raf, Ras est capable d'activer la cascade des MAPkinases (Mitogen-Activated Protein kinases) contrôlant ainsi la progression du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Figure 22) (Samatar and Poulikakos). De plus, Ras, de par son action sur la PI3K, peut conduire à la stimulation d'Akt qui est impliqué dans la régulation du métabolisme, la prolifération et la motilité cellulaire (Karnoub and Weinberg, 2008). Certains membres de la famille Ras régulent également l'adhésion cellulaire et la synthèse protéique (respectivement les protéines Rap (Ras-related proteins) et Rheb (Ras homolog enriched in brain)). Les protéines de la famille Ras set tambiés out famille Ras sont également connues pour leur propriété oncogénique. En effet, des études ont mis

en évidence la présence de mutations les rendant constutivement actives dans les gènes codant les protéines Ha-Ras, Ki-Ras et N-Ras dans 30% des cancers humains.

Les protéines de la famille Ras sont activées par des facteurs d'échanges contenant un domaine Cdc25. Ce domaine est très conservé de la levure à l'humain et suffit pour l'activité catalytique (Cherfils and Zeghouf, 2013).



Figure 22 : Voies de signalisation contrôlées par la protéine Ras (Karnoub and Weinberg, 2008).

#### C. La famille Rho

La famille Rho, pour Ras homologous, est composée de 22 membres chez les mammifères. Les Rho GTPases sont subdivisés en six grandes sous-familles en fonction de leur similarité de séquence en acides aminés. Ainsi, on retrouve les sous-familles Rho, Rac, Cdc42, RhoBTB, Rnd et Miro. Ces protéines sont impliquées principalement dans la mise en place de la polarité, la morphologie et la motilité de la cellule essentiellement par une régulation du cytosquelette d'actine (Jaffe and Hall, 2005; Pertz). Parmi les effecteurs des Rho activées, on retrouve des Ser/Thr kinases telles que ROCK (Rho-associated protein kinase) qui joue un rôle majeur dans la régulation du cytosquelette d'actomyosin (Julian and Olson). En phosphorylant la phosphatase MLCP (myosin light chain phosphatase), ROCK inhibe son activité et stabilise ainsi la forme phosphorylée de la chaine légère de la myosine qui est nécessaire pour l'interaction avec l'actine (Figure 23). Les protéines Rac et Cdc42 sont capables d'activer Pak (Szczepanowska, 2009) qui, en dehors de son rôle dans la dynamique du cytosquelette, est impliqué dans la survie cellulaire, la mitose et la transcription. Bien que la fonction des 3 principales protéines de la famille Rho (Rho, Rac et Cdc42) soit interconnectée, des études ont montré que Rho semble contrôler la formation des fibres de stress et des points focaux d'adhésion. En revanche Rac et Cdc42 joueraient plutôt un rôle dans les mouvements de la membrane cellulaire en induisant respectivement la formation de lamellipodes et de replis membranaires (ruffles) ainsi que de lamellipodes. Les Rho GTPases participent également à différents processus cellulaires tels que la transcription de certains gènes, le cycle cellulaire, l'activation de différentes enzymes comme la PI3K, mais également le transport vésiculaire (endocytose, sécretion et phagocytose). Des études ont également montré, par l'expression de formes dominantes négatives, qu'elles participaient à la transformation par l'oncogène Ras. Il a été mis en évidence une dérégulation de l'expression de certaines Rho-GTPases dans différentes tumeurs humaines.





## Figure 23 : Voies de signalisation contrôlées par les protéines de la famille Rho.

Les protéines de la famille régulent différentes voies de signalisation impliquées notament dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la synthèse de phospholipides.

## D. La famille Rab

La famille Rab (Ras-like protein in the brain) représente la famille de petites protéines G la plus vaste. Elle est présente chez tous les mammifères et comprend une soixantaine de membres chez l'humain. Les protéines de la famille Rab jouent un rôle dans les voies d'endocytose et de sécretion en régulant le transport vésiculaire ainsi que le trafic des protéines (Chavrier and Goud, 1999; Wandinger-Ness and Zerial). Elles sont présentes au niveau des vésicules d'endocytose et d'exocytose et servent d'étiquette aux différentes populations de vésicules (Figure 24). Sous leur forme activée, elles participent aux étapes d'initiation de formation de complexes protéiques qui vont permettre l'ancrage et la fusion

des vésicules au niveau du compartiment accepteur. Les protéines Rab1 et Rab5 participent à l'étape de fusion en régulant l'activation et le recrutement des protéines SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) Attachment protein REceptor). Les protéines de la famille Rab facilitent également la formation et le bourgeonnement des vésicules à partir du compartiment donneur ainsi que leur transport et adressage vers le compartiment accepteur (Lo et al.). La localisation à la membrane de ces protéines est dépendante de leur modification lipidique en C-terminal par prénylation (Chavrier et al., 1991). Deux études ont mis en évidence que les Rab-GEF sont en partie responsables de leur adressage au niveau de la membrane de compartiments spécifiques pour assurer leur rôle dans le transport vésiculaire.

Des études ont mis en évidence l'implication de certaines protéines Rab dans des pathologies, notamment au niveau neurologique (maladie de Parkinson, maladie d'Huntington...) (Breda et al.; Li et al., 2009; MacLeod et al.) mais également dans des cancers.



Figure 24 : Rôle des protéines de la famille Rab dans le trafic vésiculaire intracellulaire (Stenmark, 2009).

## E. La famille Ran

La protéine Ran (Ras-like nuclear) est l'unique membre de la famille Ran chez l'humain. Elle représente la petite protéine G la plus abondante dans la cellule et est connue pour son rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique de protéines et d'ARN (Stewart, 2007). Des études ont également mis en évidence le rôle de Ran dans l'organisation des microtubules lors de la phase de mitose du cycle cellulaire. Elle est également impliquée dans la réplication de l'ADN et dans l'assemblage de l'enveloppe nucléaire. Contrairement aux autres petites protéines G, la fonction de Ran est dépendante d'un gradient spatial entre sa forme GDP et sa forme GTP. En effet Ran-GDP se retrouve localisée au niveau du cytoplasme alors que Ran GTP se concentre au niveau du noyau. Cette particularité repose sur la localisation asymétrique de ses régulateurs Ran-GEF et GAP respectivement au niveau du noyau et du cytoplasme. Ce gradient lui permet d'assurer ses fonctions et impose la directionalité du transport (Cherfils and Zeghouf, 2013).

## F. La famille Arf

La famille Arf, ADP-rybosylation factor, est constituée des protéines Arf et d'une vingtaine de protéines apparentées, comme Sar (Secretion-associated and Ras-related), les Arl (Arf-like), Arp (Arf-related protein) et Ard (Arf domain).

Ici, je détaillerai plus particulièrement les protéines Arf.

## 1. Les protéines Arf

Les protéines Arf ont été initialement identifiées pour leur capacité à agir en tant que cofacteur de la toxine du choléra. En effet, elles sont capables de stimuler l'ADP-rybosylation de la sous-unité Gas, la protéine stimulatrice du système adenylatecyclase, par la toxine du choléra (Kahn and Gilman, 1984, 1986). Les protéines Arf sont très conservées au cours de l'évolution et sont présentes chez tous les mammifères. Elles sont, comme les protéines Rab, impliquées dans la régulation du transport vésiculaire.

On retrouve chez les mammifères six isoformes subdivisés en trois classes selon leurs homologies de séquence. La classe I est composée d'Arf1, Arf2 et Arf3, la classe II comprend Arf4 et Arf5 et Arf6 est l'unique membre de la classe III.

Les protéines Arf oscillent entre une forme liée au GDP relativement soluble et une forme liée au GTP fortement liée aux membranes. Contrairement aux protéines Ras, Rho et Rab qui subissent des modifications lipidiques au niveau C-terminal, les protéines Arf sont myristylées au niveau de leur hélice amphipatique en N-terminale ce qui permet la localisation de ces dernières au voisinage des membranes. Lors du passage sous la forme GTP, il se produit au sein des protéines Arfs une bascule de l'hélice amphipatique qui va permettre à l'interswitch de prendre sa place et empêcher sa fermeture. Ainsi la face hydrophobe de cette hélice amphipatique se retrouve exposée et va s'ancrer au niveau des membranes (Figure 25) (Antonny et al., 1997; Franco et al., 1993, 1995, 1996).





# Figure 25 :Représentation schématique et structure 3D de la bascule GTP-dépendante de l'hélice N-terminale d'Arf6 (Menetrey et al., 2000).

Lors de leur activation les protéines Arfs changent de conformation exposant ainsi leur face hydrophobe qui va s'ancrer au sein des membranes.



Figure 26 : Comparaison des structures 3D d'Arf6-GDP et d'Arf1-GDP (d'après (Menetrey et al., 2000).

Arf1 est représenté en gris foncé et Arf6 en gris clair

## 2. <u>La protéine Arf1</u>

L'isoforme Arf1 est la mieux caractérisée des protéines Arf. Des études ont permis de localiser Arf1 au niveau de l'appareil de Golgi où elle régule à différents niveaux la formation de vésicules recouvertes d'un manteau protéique dans les voies d'exocytose et de trafic vésiculaire intracellulaire.

### a) Arf1 dans le trafic vésiculaire

Elle est recrutée sous sa forme GDP par la protéine p23 qui est une protéine transmembranaire résidante dans le Golgi. Suite à son activation, Arf1 se dissocie de p23 permettant ainsi à Arf1 de recruter le manteau COPI, un complexe heptamérique de 700kDa cytosolique. Ce manteau va permettre le bourgeonnement de vésicules impliquées dans le transport rétrograde du Golgi vers le réticulum endoplasmique et le transport antérograde intra-golgien. Suite à l'action d'une Arf-GAP qui induit le retour d'Arf1 sous sa forme GDP, le manteau COPI se désassemble, permettant ainsi l'acheminement et la fusion de la vésicule avec le compartiment donneur (Figure 27) (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group Nature Reviews | Molecular Cell Biology

# Figure 27 : Schéma du rôle de la protéine Arf1 dans la formation de vésicule au niveau de l'appareil de Golgi (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).

La protéine Arf1 recutée sous sa forme GDP au niveau de l'appareil de Golgi permet, une fois activée, le recrutement du manteau COPI permettant la formation de vésicule.

Cependant il a été montré qu'Arf1 se localise également au niveau de la membrane plasmique où elle régule l'endocytose par une action sur la protéine Cdc42 (Kumari and Mayor, 2008). En effet, sous sa forme liée au GTP, Arf1 est capable de recruter à la membrane plasmique la RhoGAP, ARHGAP10, qui va réguler l'activité de Cdc42 à la surface cellulaire.

Arf1 est également impliquée dans le transport de vésicules recouvertes de clathrine. Il a été montré qu'Arf1 est capable de recruter les complexes protéiques adaptateurs AP-1 et AP-4 au niveau du TGN, et GGA et AP-3 au niveau des endosomes (Bonifacino and Glick, 2004).

Il a été montré qu'Arf1 sous sa forme GTP recrute, au niveau de membranes artificielles mimant la composition lipidique de l'appareil de Golgi, la protéine à domaine BAR Arfaptine 2 (Shin and Exton, 2001). Le recrutement de l'Arfaptine2 est aussi sous la dépendance de la courbure membranaire et à haute concentration, elle est capable d'induire la formation de tubules.

#### b) Arf1 régule la composition lipidique des membranes

De plus, Arf1 est capable de réguler la composition lipidique des membranes en recrutant et régulant différentes enzymes. Des études montrent qu'Arf1 est capable d'activer la phospholipase D (Kim et al., 1998), une enzyme connue pour son rôle dans le transport vésiculaire en hydrolysant la phosphatidylcholine en acide phosphatidique. Cette activation est sensible à la brefeldin A (Shome et al., 1998), un inhibiteur de certains facteurs d'échanges pour les Arf. Arf1 a également été montré comme étant un activateur de la synthèse du PI-4P et du PI(4,5)P<sub>2</sub> (Jones et al., 2000) qui sont deux lipides importants pour le fonctionnement du Golgi. En effet Arf1 est capable de recruter et d'activer directement l'enzyme PI-4-kinase ainsi que la PI-4 phosphate 5-kinase qui en phosphorylant le PI4P va produire du PI(4,5)P<sub>2</sub>.

#### c) Arf1 régule l'assemblage de l'actine au niveau du Golgi

Des études ont également montré qu'Arf1 est capable de réguler l'assemblage de l'actine au niveau du Golgi. En effet, le recrutement de COPI au niveau du cis-Golgi, induit par Arf1, déclenche la polymérisation de l'actine induite par le complexe Arp2/3. Ce mécanisme est dépendant de la GTPase Cdc42 et de son effecteur N-WASP. De plus Arf1 régule ce mécanisme via son interaction avec ARHGAP10, une GAP qui va réguler Cdc42 (Dubois et al., 2005; Heuvingh et al., 2007).

#### 3. <u>La protéine Arf6</u>

Arf6 est l'unique membre de la classe III de la famille Arf. C'est le membre le moins conservé et partage 66% d'identité de séquences avec Arf1 (Figure 26). Arf6 se localise principalement à la membrane plasmique et au niveau des compartiments endosomaux. L'implication d'Arf6 dans différents processus cellulaires a été mise en évidence par l'utilisation de mutants comme le dominant négatif Arf6<sup>T27N</sup> et le constitutivement actif Arf6<sup>Q67L</sup>. Elle intervient dans la régulation de différents processus cellulaires tels que le trafic vésiculaire dans les voies d'internalisation, de sécrétion et de recyclage, la cytokinèse et la régulation du cytosquelette d'actine (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Arf6 interagit et active aussi des enzymes régulant le métabolisme des phospholipides. En effet, il a été montré qu'Arf6, tout comme Arf1, active la PIP5K de type I ainsi que la phospholipase D (Begle et al., 2009; Caumont et al., 1998). De plus, l'acide phosphatidique formé, suite à l'activité de la phospholipase D, agit comme co-facteur pour l'activation de la PIPK. Le PIP<sub>2</sub> et l'acide phosphatidique ainsi produits sont des phospholipides important pour la localisation des protéines au sein de la membrane, le recrutement de différents effecteurs et la fluidité de la membrane.

#### a) Arf6 dans l'endocytose

L'implication de la petite protéine G Arf6 dans l'endocytose fait depuis plusieurs années l'objet de nombreuses études. Arf6 est impliquée dans l'internalisation de nombreux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), comme le récepteur à l'hormone leutinine, le récepteur a l'angiotensine de type 1, le récepteur à la vasopressine de type 2 et le récepteur β2-adrénergique (Altschuler et al., 1999; Brown et al., 2001; Houndolo et al., 2005; Radhakrishna and Donaldson, 1997). L'internalisation de l'ensemble de ces récepteurs s'effectue par la voie clathrine dépendante et il a été mis en évidence que la diminution d'expression d'Arf6 dans des cellules HEK-293 altère l'internalisation de ces RCPG (Hunzicker-Dunn et al., 2002).

De plus, une étude menée au sein du laboratoire a mis en évidence qu'Arf6 interagit avec la protéine adaptatrice AP-2 (Paleotti et al., 2005). En effet, par des expériences in vitro, on a pu observer qu'Arf6-GTP recrute AP-2 au niveau de liposomes artificiels. Le laboratoire a également démontré que cette interaction est présente au niveau de la cellule et que l'expression du mutant constitutivement actif d'Arf6 induit la redistribution d'AP-2 à la membrane plasmique dans des zones enrichies en Arf6-GTP. Ces résultats ont été confirmés par l'équipe du Dr Claing qui a montré, dans des cellules HEK-293, la formation d'un complexe composé d'Arf6-GTP, de la sous-unité  $\beta$  d'AP-2 et de la chaine lourde de la clathrine suite à une stimulation par l'angiotensine II (Poupart et al., 2007). De part son action sur la synthèse de PIP2 et son interaction avec ces deux protéines essentielles, Arf6 pourrait induire le recrutement de composants du manteau protéique. L'effet d'Arf6 sur l'endocytose dépendante de la clathrine serait également régulé par la protéine Arf-GAP SMAP1 (Kon et al., 2008) qui interagit directement avec la chaine légère de la clathrine.

Arf6 interagit également avec la  $\beta$ -arrestine contrôlant ainsi l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique suite à son activation par un agoniste (Macia et al., 2012). Arf6-GTP est également capable de recruter à la membrane plasmique le facteur d'échange ARNO (Arf nucleotide-binding site opener), qui lui aussi interagit avec la  $\beta$ -arrestine et stimule l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique (Claing et al., 2001).

Arf6 a aussi été décrit comme étant un régulateur de l'assemblage et désassemblage des jonctions adhérentes dans les cellules polarisées en contrôlant l'internalisation de la E-cadhérine (Xu et al., 2015). En effet l'E-cadhérine est constitutivement recyclée de la membrane basolatérale vers les endosomes et l'activation d'Arf6 induit une stimulation de son endocytose clathrine dépendante. Des études menées sur des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ont mis en évidence qu'Arf6-GTP est capable de recruter, au niveau des jonctions cellulaires, la protéine Nm23-H1 (Palacios et al., 2002). Nm23-H1 est une enzyme capable de catalyser le transfert du troisième phosphate de l'ATP vers le GDP. Ce mécanisme permet de fournir une source de GTP nécessaire à la dynamine pour induire la fission des vésicules. De plus, le recrutement de Nm23 induit une régulation négative de l'activité de la protéine Rac1, facilitant ainsi le désassemblage des jonctions adhérentes.

Différentes études ont montré qu'en plus de son rôle dans l'endocytose dépendante de la clathrine, Arf6 régule également les autres voies d'endocytose. Ainsi une étude de 2005 a mis en évidence l'implication d'Arf6 dans la voie caveolae dépendante. En effet, la transfection d'un siRNA dirigé contre Arf6 dans des cellules HEK 293 entraine une diminution de 79% de l'internalisation du récepteur à l'endotheline de type B (Houndolo et al., 2005).

Arf6 régule également l'endocytose du récepteur muscarinique à l'acétylcholine M2 (Houndolo et al., 2005). Bien que mal caractérisée, la voie d'endocytose utilisée par ce récepteur semble être indépendante de la clathrine et des cavéoles, et implique les protéines Arf6 et Rab22 (Reiner and Nathanson, 2008). Ainsi la surexpression d'un mutant constitutivement actif Arf6<sup>Q67L</sup> ou d'un activateur d'Arf6 dans des cellules Hela inhibe de 50% l'internalisation de ce récepteur.

De par son action sur le remodelage de la membrane plasmique Arf6 régule les processus de macropinocytose et de phagocytose. Ainsi, une étude a mis en évidence que l'activation d'Arf6, par surexpression de son facteur d'échange EFA6, induit le développement de macropinosomes par formation de protrusions membranaires et fusion avec la membrane plasmique. La surexpression des mutants dominant négatif et constitutivement actif, Arf6<sup>T27N</sup> et Arf6<sup>Q67L</sup> respectivement, induit aussi l'inhibition de la phagocytose des érythrocytes recouverts d'Immunoglobuline G (Someya et al., 2010; Zhang et al., 1998).

Il également été montré qu'Arf6 facilite l'invasion des cellules par le pathogène *Salmonella enterica* (*Humphreys et al., 2013*). Arf6 colocalise avec la bactérie et permet, suite à son activation par les protéines EFA6 et Brag2, le recrutement du facteur d'échange ARNO. ARNO va alors activer Arf1 qui en association avec Rac1-GTP, permet le remodelage du cytosquelette d'actine qui facilite l'entrée du pathogène par macropinocytose.
#### b) Arf6 dans le recyclage

Une fois internalisées, les molécules convergent vers les endosomes précoces puis vont être redirigées en fonction de leur devenir. Le recyclage à la membrane s'effectue soit directement à partir de ces endosomes soit plus tardivement à partir d'endosomes de recyclage péricentriolaire. Des études ont montré qu'Arf6 est impliquée dans ce processus de recyclage. Une équipe a mis en évidence qu'Arf6 est essentiel pour le recyclage de l'intégrine  $\beta$ 1 induite par le HGF (Hongu et al., 2015; Powelka et al., 2004). Cet effet d'Arf6 est régulé par ces facteurs d'échange comme Grp1, GEP100 et EFA6. De plus, il a été montré dans les cellules humaines Hela que l'activité d'Arf6 affectait le recyclage de protéines qui ne possèdent pas de séquences cibles cytoplasmiques de reconnaissance à AP-2/clathrine comme la sous-unité  $\alpha$  du récepteur IL2 et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH) (Naslavsky et al., 2003; Radhakrishna and Donaldson, 1997). Une étude récente a montré qu'Arf6 s'associe aux vésicules recouvertes de clathrine pour faciliter le recyclage rapide du récepteur à la transferrine (Montagnac et al., 2011; Montagnac et al., 2009). Suite au désassemblage du manteau de clathrine, Arf6-GTP va pouvoir interagir avec les protéines d'échafaudage JIP3 et JIP4 (JNK interacting protein). Cette interaction inhibe celle des protéines JIP avec la kinésine 1 mais favorise leur liaison avec le complexe dynéine. Une étude menée au laboratoire a également mis en évidence qu'Arf6 régulait négativement le recyclage rapide du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique (Macia et al., 2012). En effet, suite à la stimulation du récepteur β2 adrénergique, l'activation d'Arf6 ligand dépendante inhibe le recyclage rapide de ce récepteur dépendant probablement de la petite protéine G Rab-4.

Arf6 est impliquée dans l'internalisation et le recyclage de différents ligands par l'intermédiaire de multiples voies d'endocytose comme celle dépendante de la clathrine, celle dépendante de la cavéole et celle indépendante de la clathrine et des cavéoles. Ainsi par une approche de knockdown par siRNA, il a été mis en évidence qu'Arf6 régule l'internalisation de nombreux récepteurs tels que certains récepteurs couplés aux protéines G et le récepteur à l'EGF.

#### c) Arf6 dans le remodelage du cytosquelette d'actine

Arf6 a également été impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine ainsi que dans des processus qui nécessitent des changements rapides de la morphologie cellulaire. Ainsi, Arf6 est impliqué dans la formation des pseudopodes, de replis de la membrane plasmique et d'extensions membranaires au niveau des endosomes. Elle a également un rôle dans la croissance des neurites (Eva et al., 2012), la migration des neurones et la cytokinèse (Schweitzer and D'Souza-Schorey, 2005; Schweitzer et al., 2011). L'action d'Arf6 sur le remodelage du cytosquelette d'actine est due à l'activation de Rac1 ainsi qu'à l'activation des enzymes de modifications lipidiques (cf paragraphe précédent). Des études ont montré dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) et HeLa, qu'Arf6 induisait la redistribution de Rac1 des endosomes vers la membrane plasmique et ainsi altérait la polymérisation de l'actine (Radhakrishna et al., 1999). Arf6-GTP interagit aussi avec la protéine POR1, un effecteur de Rac1 et l'Arfaptin 2. POR1 semble être un élément de régulation important dans la réorganisation du cytosquelette induite par Arf6 (D'Souza-Schorey et al., 1997).

Différentes protéines ArfGAP ont également été impliquées dans ce processus de régulation du cytosquelette d'actine induite par Arf6 (Klein et al., 2006). Des études ont mis en évidence que l'expression dans les cellules du mutant Arf6<sup>T157N</sup>, se chargeant rapidement en GTP, induisait la formation de larges protrusions membranaires. En revanche, l'expression du triple mutant Arf6Q37E/S38I/T157N, dont les mutations Q37E et S38I empêchent l'interaction avec les protéines ArfGAP et notamment ACAP1 (ArfGAP With Coiled-Coil, Ankyrin Repeat And PH Domains 1) et ASAP1 (ArfGAP With SH3 Domain, Ankyrin Repeat And PH Domain 1), inhibe le phénotype induit par le mutant Arf6<sup>T157N</sup>. En effet, on observe dans ces cellules un blocage de la formation des protrusions membranaires ainsi que de toute réorganisation du cytosquelette d'actine induit par l'expression d'Arf6<sup>T157N</sup>. Le cycle GDP/GTP d'Arf6 étant essentiel pour son rôle dans le remodelage de l'actine, ces résultats suggèrent que les protéines ArfGAP pourraient agir comme des effecteurs d'Arf6 importants pour cette fonction.

La protéine ArfGAP, ARAP2, est impliquée dans la formation des adhésions focales qui sont des structures dynamiques qui connectent le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire. Des expériences ont démontré que la protéine ARAP2 est capable de diminuer le niveau d'expression d'Arf6-GTP et par conséquence celui de Rac1-GTP (Chen et al., 2013). Néanmoins, les quantifications du nombre et de la taille des adhésions focales ont mis en évidence que ce changement d'activité d'Arf6 et Rac1 était nécessaire mais insuffisant pour le contrôle de ces structures par cette GAP.

#### d) Arf6 dans les pathologies

Arf6 est notamment impliqué dans différentes pathologies. En plus de son action au niveau de la membrane plasmique et du cytosquelette d'actine, Arf6 régule différentes voies de signalisation impliquées dans la motilité cellulaire et l'invasion, et de ce fait se retrouve impliqué dans de nombreux cancers. Une étude récente a mis en évidence l'implication de l'activation d'Arf6 dans la régulation de l'internalisation de la E-cadhérine induite par l'EGF dans des cellules cancéreuses mammaires (Xu et al., 2015).

Arf6 joue également un rôle dans l'invasion par les mélanomes et dans la formation de métastases (Grossmann et al., 2013). Une étude a mis en évidence qu'en se fixant au récepteur Frizzled 4–LRP6 (low-density lipoprotein receptor–related protein 6), Wnt5A est capable d'activer la protéine Arf6. Cette activation induit une dissociation entre  $\beta$ -caténine et la N-cadhérine. Cette libération de la  $\beta$ -caténine a pour conséquence une déstabilisation des jonctions adhérentes et une augmentation de l'activité transcriptionelle par translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau aboutissant à un phénotype invasif. Il a également été montré que l'inhibition d'Arf6 freinait les propriétés invasives des cellules de mélanomes en cultures et réduisait les métastases pulmonaires chez la souris.

Des analyses cliniques ont démontré que la protéine Arf6 était surexprimée dans des échantillons de tumeurs mammaires triples négatives, qui sont des tumeurs très agressives et corrélées à un faible pronostique (Eades et al., 2015). Cette surexpression est d'autant plus importante au niveau des métastases des ganglions lymphatiques, suggérant un rôle important d'Arf6 dans l'acquisition des propriétés métastatiques.

Récemment une voie dépendante de NEDD9/Arf6 a été impliquée dans la régulation de l'invasion cellulaire et le développement de métastases à partir de tumeur mammaire

64

(Loskutov et al., 2015). NEDD9 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 9) est une protéine cytosolique, nécessaire à la migration des cellules mésenchymales et à l'invasion induite par la protéolyse de la matrice extracellulaire. Cette étude a mis en évidence que NEDD9 était capable d'interagir avec ARAP3 et GGA3, respectivement une GAP et un effecteur d'Arf6, facilitant ainsi l'inactivation d'Arf6. Sous sa conformation GDP Arf6 permet l'internalisation au niveau des endosomes tardifs du complexe formé par la métalloprotéinase de la matrice MMP14 et son inhibiteur TIMP2 (TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2). Une fois internalisée la protéine MMP14 va pouvoir se dissocier de son inhibiteur et être recyclée vers la membrane plasmique sous une forme pleinement active permettant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire nécessaire à l'invasion.

Arf6 est impliqué aussi au niveau neuronal dans la formation du peptide Amyloide  $\beta$  qui est un constituant majeur des plaques séniles qui caractérisent la maladie d'Alzheimer (Sannerud et al., 2011; Tang et al., 2015). Une étude a mis en évidence qu'Arf6 contrôle le trafic intracellulaire de la protéine BACE1 ( $\beta$ -Site APP-Cleaving Enzyme 1) (Sannerud et al., 2011), une des enzymes responsable du clivage du précurseur APP (Amyloid  $\beta$  Precursor Protein). Ainsi, une dérégulation du niveau d'expression ou de l'activité d'Arf6 affecte le tri au niveau des endosomes de BACE1 altérant ainsi la production du peptide Amyloide  $\beta$ .

Arf6 joue également un rôle crucial dans l'homéostasie du cholestérol. Dans la maladie de Niemann-Pick de type C, on retrouve un défaut du trafic endosomal qui conduit à une accumulation du cholestérol libre et d'autres lipides au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes. Une étude a mis en évidence que l'expression du mutant d'Arf6 constitutivement actif réverse en partie le phénotype de cette maladie en augmentant notamment l'efflux extracellulaire du cholestérol (Schweitzer et al., 2009).

# IV. Les facteurs d'échange à domaine Sec7

### A. Généralités

La famille des facteurs d'échange spécifiques aux petites protéines G Arf, également appelée famille à domaine Sec 7, est subdivisée en deux sous-familles en fonction de leurs homologies de séquence et de leurs poids moléculaire.



Figure 28 : Famille des facteurs d'échange à domaine Sec7 (adapté de (Casanova, 2007; Jackson and Casanova, 2000). La première sous-famille est composée de facteurs d'échange possédant un haut poids moléculaire, supérieur à 100kDa. On retrouve dans cette sous-famille une première classe de facteurs d'échange composée des protéines de levure Gea1p et Gea2p, la protéine GNOM/Emb30p et la protéine GBF1. La deuxième classe des facteurs d'échange à haut poids moléculaire est composée de la protéine de levure Sec7p et des protéines BIG1 et BIG2. La protéine de levure Syt1p constitue à elle seule la troisième classe. La majorité des protéines de cette sous-classe est localisée principalement au niveau de l'appareil de Golgi.

La seconde sous-famille est constituée de protéines ayant un bas poids moléculaire. Elle est composée des protéines ARNO, Cytohesin-1, GRP1/ARNO3, Cytohesin-4, et EFA6. Elle est également composée de la famille des protéines BRAG. L'ensemble des membres de cette sous-famille possède un domaine PH qui permet le recrutement aux membranes par interaction avec des phospholipides spécifiques (Figure 28).

#### B. Structure

Bien que très divergentes au niveau de leurs séquences l'ensemble de ces protéines possèdent toutes une région d'environ 200 acides aminés très similaire à la protéine de levure Sec7p et appelée domaine Sec7. Le domaine Sec7 correspond au domaine catalytique de ces facteurs d'échange et il a été montré que ce domaine seul suffisait pour permettre l'échange nucléotidique GDP/GTP des protéines de la famille Arf (Chardin et al., 1996). Ce domaine est composé de dix α-hélices (nommées hélices A à J) qui s'organisent en structure tertiaire pour donner deux sous-domaines (Figure 29). Les sept premières  $\alpha$ -hélices vont former une super-hélice au niveau N-terminal alors que l'on retrouve un «paquet» positionné en C-terminal de cette super-hélice. On retrouve également une profonde poche hydrophobe composée des hélices F, G et H qui possèdent des motifs très conservés au sein des membres de la famille à domaine Sec7 (Cherfils et al., 1998; Goldberg, 1998; Mossessova et al., 1998). Il a été montré, par des expériences de mutagenèse, que cette poche correspond au site actif du domaine Sec7. Le modèle proposé, concernant la catalyse de l'échange nucléotidique est que les protéines Arf-GDP viendraient se lier au niveau de cette poche hydrophobe entrainant un changement de conformation au niveau des protéines Arf. Ce changement de conformation rapprocherait le site de liaison au nucléotide d'un résidu glutamate très conservé au niveau du domaine Sec7, et connu sous le nom de «doigt

67

glutamate». Le glutamate viendrait déplacer l'ion  $Mg^{2^+}$  et la proximité entre le glutamate et le  $\beta$ -phosphate du GDP aurait pour conséquence une répulsion électrostatique et une expulsion du GDP (Beraud-Dufour et al., 1998). Le GTP viendrait ensuite se lier au niveau du site de liaison au nucléotide et ainsi former l'état «actif» Arf-GTP (Figure 30).



# Figure 29 : Représentation de la structure 3D d'un domaine Sec7 d'ARNO (d'après Dinitto et al. 2007).

Le domaine Sec7 est représenté en gris, le domaine PH est en turquoise et l'hélice Cterminale est en rouge.



# Figure 30 : Représentation de la structure 3D du complexe Arf1/domaine Sec7 de BRAG2 (d'après Aizel et al. 2013).

Arf1 est représenté en rose, les domaines Sec7 et PH-Cterminal de BRAG2 sont respectivement en gris et turquoise.

### C. Les facteurs d'échange à haut poids moléculaire

Les protéines GBF1, BIG1 et BIG2 sont des facteurs d'échanges pour les protéines Arf de classe I et II. Bien que toutes 3 présentes au niveau de l'appareil de Golgi, GBF1 se localise principalement au niveau du cis-golgi alors que les protéines BIG1 et 2 sont au niveau du TGN. Des expériences ont permis d'établir le rôle de GBF1 dans le trafic de vésicules recouvertes du manteau COPI (Kawamoto et al., 2002). La protéine BIG2 est impliquée dans le recrutement des protéines adaptatrices AP-1 et GGA au niveau du TGN (Shinotsuka et al.,

2002) alors que BIG1, via son interaction avec un des membres de la famille kinésine 21A, joue un rôle dans le processus de transport cellulaire (Shen et al., 2008).

#### D. La famille des cytohésines

La famille des cytohésines semble être à ce jour la mieux caractérisée. Elle est composée de 4 isoformes, la cytohésine 1, la cytohésine 2/ ARNO, la cytohésine 3/ Grp1/ARNO3 et la cytohésine-4 qui partagent 68% d'identité chez l'homme. Les cytohésine 1, 2, 3 sont ubiquitaires, mais on retrouve la cytohésine 1 préférentiellement au niveau des leucocytes. La cytohésine 4 est spécifiquement exprimée au niveau des leucocytes (Ogasawara et al., 2000). Les cytohésines sont impliquées dans différents processus cellulaires tels que la phagocytose (Sendide et al., 2005), l'endocytose de certains RCPGs par leur interaction avec les  $\beta$ -arrestines (Claing et al., 2001) et la migration cellulaire.

Au niveau cellulaire, ces protéines sont principalement localisées à la périphérie (Frank et al., 1998) et peuvent être recrutées à la membrane plasmique par interaction via leur domaine PH avec le PIP3. De plus, des études ont mis en évidence que les protéines Arl4-GTP (Hofmann et al., 2007) et Arf6-GTP (Cohen et al., 2007) étaient également capables de recruter ARNO à la membrane plasmique.

Des expériences in vitro ont mis en évidence que la famille des cytohésines était plus active sur les Arf de classe I. Néanmoins, la protéine ARNO est capable, après surexpression, d'activer la protéine Arf6 endogène dans des cellules.

#### E. La famille des BRAG

La famille des protéines BRAG est composée de trois membres : les protéines BRAG1, BRAG2 (ou GEP100) et BRAG3 possédant chacune au moins 2 isoformes. Bien que plusieurs expériences aient mis en évidence que ces protéines étaient capables d'activer les protéines Arf, aucune spécificité évidente n'a encore été démontrée. Différentes études ont mis en évidence l'implication de ces protéines dans différents proccessus biologiques. Ainsi elles jouent un rôle dans l'endocytose et notamment celle de l'intégrine  $\beta$ 1 (Dunphy et al., 2006), la phagocytose (Someya et al., 2010), l'adhésion cellulaire (Hiroi et al., 2006; Someya et al., 2006), l'apoptose (Someya et al., 2006) et l'angiogénèse (Hongu et al., 2015). Une étude a mis en évidence une voie de signalisation dépendante du récepeteur à l'EGF et des protéines GEP100, Arf6 et AMAP1 impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses et le développement de métastases (Hashimoto et al., 2011). Suite à l'activation du récepteur à l'EGF, GEP100 interagit directement, par l'intermédiaire de son domaine PH, avec les phosphotyrosine 1068 et 1086 de ce dernier. Cette interaction permet l'activation d'Arf6 qui va, par l'intermédiaire de son effecteur AMAP1, intervenir dans la formation d'invadopodes, la dégradation et la phagocystose de la matrice extracellulaire et la perte de l'adhésion cellulaire.

#### F. Mécanismes de régulation

L'ensemble de ces facteurs d'échange peut être régulé par différents mécanismes (Cohen et al., 2007; DiNitto et al., 2007; Malaby et al., 2013). En effet, des études ont mis en évidence que ces protéines pouvaient être sous une conformation auto-inhibée par la présence notamment de replis intramoléculaires (Hiester and Santy, 2013; Stalder et al., 2011). De plus, les phospholipides semblent jouer un rôle dans ce mécanisme de régulation (cf partie résultats).

Un deuxième mécanisme impliquant des boucles rétrocontrôles a également été décrit. En effet, une étude de 2011 a mis en évidence qu'Arf6, mais également Arf1, étaient capables d'induire un rétrocontrôle positif sur l'activité d'ARNO et a permis d'aboutir au modèle en cascade selon lequel Arf6-GTP stimulerait l'activité d'ARNO induisant ainsi l'activation d'Arf1 qui à son tour maintiendrait sa propre activation (Stalder et al., 2011).

#### G. Le facteur d'échange EFA6

#### 1. <u>Structure</u>

La protéine EFA6 appartient à la famille des GEFs et est le premier membre de cette famille identifié comme étant un facteur d'échange spécifique d'Arf6. Il existe quatre isoformes de cette protéine : EFA6A, EFA6B, EFA6C et EFA6D (EFA6R/HCA67/PSD3) codés par différents gènes (respectivement PSD, PSD4, PSD2 et PSD3) (Derrien et al., 2002; Sakagami, 2008) (Figure 31). Des expériences de Northern Blot ont mis en évidence la présence d'ARN messagers de différentes tailles codant pour les différentes protéines EFA6 résultant d'un épissage alternatif de ces dernières (Derrien et al., 2002). L'expression des protéines EFA6A, EFA6B et EFA6D est ubiquitaire alors que celle d'EFA6C semble restreinte au niveau neuronal. L'organisation des domaines est conservée pour les quatre isoformes. La protéine EFA6 est composée d'un domaine variable N-terminal, d'un domaine central Sec7 qui est le domaine catalytique responsable de l'activation d'Arf6, d'un domaine PH capable d'interagir avec les phospholipides, notamment le PIP2 présent principalement à la membrane plasmique et responsable de sa localisation cellulaire. EFA6 possède également un domaine C-terminal composé d'un coiled-coil et deux domaines riches en proline lui permettant d'interagir avec de nombreux partenaires (Franco et al., 1999). Des expériences réalisées sur des cellules TRVb-1, surexprimant de façon stable le récepteur humain à la transferrine et dans lesquelles EFA6 a été surexprimé, ont mis en évidence qu'EFA6 se localise à la membrane plasmique. En effet, tout comme Arf6-GTP on retrouve EFA6 au niveau de replis membranaires et de structures similaires à des microvillosités. De plus, sa localisation est indépendante de son activité facteur d'échange pour la petite protéine G Arf6.



Figure 31 : Structure des isoformes EFA6.

Les quatres isoformes d'EFA6 sont composés d'un domaine N-terminal variable, d'un domaine Sec7 (domaine catalytique), d'un domaine PH responsable de la localisation à la membrane plasmique et d'un domaine C-terminal impliqué dans l'interaction avec différents partenaires.

#### 2. <u>Fonctions</u>

#### a) EFA6 dans le remodelage du cytosquelette d actine

Des études menées au laboratoire ont démontré qu'EFA6, tout comme Arf6, est impliquée dans la réorganisation et l'assemblage du cytosquelette d'actine (Derrien et al., 2002; Franco et al., 1999). En effet, on retrouve dans des cellules Hela surexprimant la forme sauvage d'EFA6 une accumulation et une co-localisation de l'actine filamenteuse et d'EFA6 au niveau des replis membranaires (Derrien et al., 2002; Franco et al., 1999). Par l'utilisation de différents mutants, le domaine C-terminal d'EFA6 a pu être identifié comme étant le domaine responsable de ce remodelage. La surexpression dans les cellules des mutants EFA6<sup>E242K</sup> et EFA6<sub>Δsec7</sub>, qui ne possèdent pas d'activité catalytique, entraine la formation d'extensions membranaires riches en actine. En revanche, on constate, dans les cellules surexprimant le mutant ne possédant pas le domaine C-terminal, une perte de ce phénotype

particulier. Une étude a montré que le domaine PH participait au remodelage du cytosquelette induit par le domaine C-terminal. En effet, on constate que les cellules surexprimant le domaine C-terminal seul, qui est cytosolique, ou le domaine PH seul, qui se localise au niveau des replis de la membrane plasmique, possèdent une morphologie semblable aux cellules contrôles. En revanche, quand le domaine C-terminal est couplé au domaine PH, il se localise à la membrane plasmique et induit des modifications au niveau du cytosquelette d'actine. Par ailleurs, une partie au moins de cet effet serait dû à l'activation de Rac1. Il a également été mis en évidence qu'EFA6 interagit directement avec l'actine (Macia et al., 2008; Sakagami et al., 2007) et l' $\alpha$ -actinine (Macia et al., 2008; Sakagami et al., 2007) et l' $\alpha$ -actinine (Macia et al., 2008; Sakagami et al., 2007). L' $\alpha$ -actinine est une protéine de réticulation capable de lier et de maintenir parallèle deux microfilaments d'actine entre eux pour former, en collaboration avec la myosine II, des filaments d'actine contractiles. L' $\alpha$ -actinine participe entre autre à la formation de fibres de stress composées d'actine et à la mise en place des jonctions cellulaires.

#### b) EFA6 dans la mise en place de la polarité épithéliale

Les cellules épithéliales polarisées sont définies par deux domaines distincts au niveau de la membrane plasmique: un domaine basolatéral et un domaine apical faisant face au lumen. Ces deux domaines membranaires sont séparés par un complexe protéique appelé jonctions serrées. La mise en place de ces jonctions se fait par un processus dépendant du calcium et amorcé par la E-cadherine. EFA6 est impliqué dans l'établissement de la polarité épithéliale (Figure 32) (Klein et al., 2008; Luton et al., 2004). Les expériences de surexpression et de répression d'EFA6 indiquent que son niveau d'expression est important pour contrôler l'assemblage des jonctions serrées et contribuer au développement de la polarité épithéliale. En effet, EFA6 est capable de promouvoir la rétention des protéines composant les jonctions serrées au niveau de la membrane plasmique. L'utilisation de mutants catalytiquement inactif ou ne possédant pas le domaine C-terminal a permis de démontrer que les domaines Sec7 et C-terminal d'EFA6 étaient nécessaire. De plus, EFA6 agit en stabilisant l'anneau d'actine apical qui supporte les jonctions serrées. D'autres expériences menées au laboratoire ont également démontré qu'EFA6 était la cible de l'enzyme de déubiquitination USP9x (Ubiquitin Specific Peptidase 9, X-Linked), la protégeant ainsi de la

dégradation et permettant l'augmentation d'expression d'EFA6 à la zone de contact primordiale nécessaire à la mise en place de la polarité épithéliale (Theard et al., 2010).



#### Figure 32 : Rôle d'EFA6 et d'Arf6 dans la mise en place de la polarité épithéliale.

EFA6 contrôle l'assemblage des jonctions sérrées et stabilisent l'anneau d'actine apical supportant ces dernières.

#### c) EFA6 dans l'internalisation et le recyclage

EFA6 est impliqué dans les mécanismes d'internalisation et de recyclage de différentes protéines membranaires. Ainsi, la surexpression d'EFA6 ou du mutant d'Arf6 bloqué sous forme GTP entraine une diminution drastique de l'internalisation de la transferrine (Franco et al., 1999). De plus l'expression d'EFA6 affecte la distribution du récepteur à la transferrine dans des cellules TRVb-1. En effet, on retrouve dans des cellules contrôles une localisation de ce récepteur intracellulaire au niveau de tubules et vésicules péricentriolaires, alors qu'il est redistribué majoritairement à la membrane plasmique par une inhibition de son internalisation induite par la surexpression d'EFA6 dans les cellules.

EFA6 forme, uniquement quand il est lié à son substrat Arf6, un complexe avec le canal potassique TWIK1 (Decressac et al., 2004). Cette interaction serait importante pour les

mécanismes d'internalisation et de recyclage de ce canal mais également d'autres protéines, comme le récepteur à la transferrine. La surexpression de TWIK1 dans les cellules inhibe l'internalisation de la transferrine et ce processus est dépendant de son interaction avec EFA6.

Une étude récente menée au laboratoire a mis en évidence l'implication d'EFA6 dans le recyclage du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique (Macia et al., 2012). Ce récepteur couplé aux protéines G se situe au niveau des muscles lisses vasculaires, bronchiques, intestinaux et génito-urinaires mais également au niveau du muscle strié et des hépatocytes. Il est activé par ses ligands endogènes : les catécholamines (adrénaline et noradrénaline). Il est aussi sensible à l'action d'agonistes comme l'isoprotérenol ou le salbutamol et d'antagonistes comme le propanolol. Le récepteur  $\beta$ 2 adrénergique est un récepteur internalisé de manière dépendante du ligand et de la  $\beta$ -arrestine. Ainsi, les expériences ont démontré que le domaine C-terminal de la  $\beta$ -arrestine sert de plateforme et interagit directement et de manière simultanée avec EFA6 et son substrat Arf6-GDP. Cette interaction est ligand dépendante et conduit à l'activation d'Arf6 in vivo (Figure 33). De plus, cette étude a montré que la surexpression d'EFA6 inhibe le recyclage rapide du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique, probablement par la voie Rab4 dépendante et permet son accumulation dans la voie de dégradation au niveau des endosomes tardifs et lysosomes.



Figure 33 : Rôle d'EFA6 et d'Arf6 dans l'internalisation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique.

Suite à l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique, la  $\beta$ -arrestine recrute à la membrane plasmique EFA6 et son substrat Arf6-GDP permettant l'activation de cette dernière.

#### d) EFA6 dans les pathologies

EFA6 est une protéine impliquée dans différents processus biologiques essentiels à l'homéostasie de la cellule comme la réorganisation du cytosquelette d'actine et le trafic vésiculaire. Elle est aussi impliquée dans la mise en place et le maintien de la polarité épithéliale. Ainsi EFA6 et son substrat Arf6 ont été décrits comme impliqués dans différents cancers.

Mon laboratoire d'accueil a mis en évidence qu'EFA6 est impliquée dans le cancer du sein (Zangari et al., 2014). En effet, le niveau d'expression d'EFA6 endogène est critique pour la détermination du statut épithélial-mésenchymal en culture 3D de cellules mammaires humaines. De plus, des analyses transcriptomiques et immunohistochimiques de tumeurs cancéreuses mammaires humaines ont mis en évidence qu'une diminution d'expression d'EFA6 est corrélée à une augmentation de la signature de transition epithélio-mésenchymateuse et un mauvais pronostique pour les patientes. Ainsi, EFA6 a été identifié comme étant un antagoniste du développement de tumeurs cancéreuses mammaires.

EFA6 a également été impliqué dans les processus d'invasion cellulaire des gliomes (Li et al., 2006). En effet, une étude a mis en évidence que l'expression d'EFA6 est augmentée dans des échantillons de tissus de gliomes humains. EFA6 a été décrit comme augmentant la motilité et la capacité d'invasion par une voie de signalisation dépendante d'Arf6 et d'Erk.

Résultats partie 1 : Etude de l'interaction entre EFA6 et l'endophiline

# Résultats partie 1 : Etude de l'interaction entre EFA6 et l'endophiline

# I. Contexte et objectif de l'étude

L'équipe « les protéines Arf, morphologie cellulaire et transport membranaire », dans laquelle j'ai effectué mon doctorat, étudie depuis de nombreuses années le rôle du facteur d'échange EFA6 et de son substrat Arf6 dans différents processus cellulaires. Ainsi ces deux protéines ont pu être impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, dans la régulation du transport vésiculaire et dans la mise en place de la polarité. Dans le but d'approfondir nos connaissances sur les fonctions d'EFA6, une recherche de partenaires a été effectuée par une expérience de double hybride chez la levure utilisant le domaine Sec7 d'EFA6 comme appât. Par cette méthode plusieurs clones codant pour l'endophiline B1 ont pu être identifiés.

Dans un premier temps mon travail a porté sur la validation de cette interaction entre EFA6 et l'endophiline dans des cellules et in vitro, et sur l'identification des domaines impliqués. Par la suite je me suis intéressée au rôle de cette interaction sur la fonction de chacune des deux protéines : l'activité catalytique d'EFA6 sur l'échange nucléotidique d'Arf6 et la capacité de l'endophiline à lier les membranes et induire la formation de tubules. Pour finir j'ai étudié la localisation cellulaire de ces deux partenaires et le rôle fonctionnel de cette interaction dans l'internalisation du récepteur à la transferrine.

Dans le but de valider cette interaction nous avons utilisé une approche biochimique avec des expériences de pull-down sur des lysats cellulaires sur-exprimant nos protéines d'intérêt ainsi que sur des protéines recombinantes purifiées. Nous avons également réalisé des expériences de flottaison sur gradient de sucrose à l'aide de vésicules lipidiques artificielles avec des degrés de courbure compatibles avec une membrane plane ou avec un puits d'endocytose en formation. Lors des expériences de flottaison, les protéines d'intérêt sont incubées en présence de liposomes puis un gradient de sucrose est déposé sur ce mélange. Suite à une ultracentrifugation, les liposomes de faible densité se retrouvent dans la fraction «top» correspondant à la partie supérieure du gradient de sucrose. Les protéines capables d'interagir avec les liposomes sont elles aussi entrainées dans la fraction «top», les autres quant à elles restent dans la fraction «bottom». A cela ce sont ajoutées des expériences de biologie cellulaire et de microscopie électronique.

L'ensemble de cette étude nous a permis de proposer un modèle rendant compte du rôle de l'interaction entre l'endophiline et EFA6 dans l'endocytose dépendante de la clathrine.

# II. Article



# Arf6 exchange factor EFA6 and endophilin directly interact at the plasma membrane to control clathrin-mediated endocytosis

Sonia Boulakirba<sup>a</sup>, Eric Macia<sup>a</sup>, Mariagrazia Partisani<sup>a</sup>, Sandra Lacas-Gervais<sup>b</sup>, Frédéric Brau<sup>a</sup>, Frédéric Luton<sup>a</sup>, and Michel Franco<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>lnstitut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 7275, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Nice Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France; and <sup>b</sup>Centre Commun de Microscopie Appliquée, Université de Nice Sophia Antipolis, 06103 Nice, France

Edited by Martha Vaughan, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, and approved May 27, 2014 (received for review January 22, 2014)

Members of the Arf family of small G proteins are involved in membrane traffic and organelle structure. They control the recruitment of coat proteins, and modulate the structure of actin filaments and the lipid composition of membranes. The ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) isoform and the exchange factor for Arf6 (EFA6) are known to regulate the endocytic pathway of many different receptors. To determine the molecular mechanism of the EFA6/Arf6 function in vesicular transport, we searched for new EFA6 partners. In a twohybrid screening using the catalytic Sec7 domain as a bait, we identified endophilin as a new partner of EFA6. Endophilin contains a Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) domain responsible for membrane bending, and an SH3 domain responsible for the recruitment of dynamin and synaptojanin, two proteins involved, respectively, in the fission and uncoating of clathrin-coated vesicles. By using purified proteins, we confirmed the direct interaction, and identified the N-BAR domain as the binding motif to EFA6A. We showed that endophilin stimulates the catalytic activity of EFA6A on Arf6. In addition, we observed that the Sec7 domain competes with flat but not with highly curved lipid membranes to bind the N-BAR. In cells, expression of EFA6A recruits endophilin to EFA6A-positive plasma membrane ruffles, whereas expression of endophilin rescues the EFA6A-mediated inhibition of transferrin internalization. Overall, our results support a model whereby EFA6 recruits endophilin on flat areas of the plasma membrane to control Arf6 activation and clathrin-mediated endocytosis.

small GTP-binding proteins | membrane curvature | vesicular trafficking

he ADP ribosylation factor family, which includes six mem-The ADP ribosylation factor family, which increases of vesicular traf-bers, is known to regulate different stages of vesicular traf-ficking (reviewed in refs. 1, 2). The most abundant isoform, Arfl, controls the membrane trafficking at the level of the Golgi apparatus by regulating in a GTP-dependent manner the recruitment of the COPI coat complex (3-5) and the two clathrin adaptors AP-1 (6, 7) and GGAs (8) onto the Golgi membranes. By activating lipid-modifying enzymes, Arf1 is able to change the lipid composition of the donor compartment membrane, thus facilitating membrane dynamic (9-12). ADP-ribosylation factor 6 (Arf6), the most distant isoform, is thought to regulate plasma membrane and endosomal trafficking. Similarly to Arf1, Arf6 activates the PLD (13, 14) and the type I PI4P5K (15, 16) to produce, respectively, phosphatidic acid, which is a fusogenic lipid, and phosphatidylinositol 4-5 bisphosphate, which is known to regulate clathrin-dependent endocytosis. Arf6 and PIP<sub>2</sub> cooperate (at least in vitro) to recruit AP-2 onto lipid membranes, suggesting a role for Arf6 in the formation of clathrin-coated pits (17). In addition to this putative role during the initial steps of internalization, Arf6 has been shown to interact and recruit Nm23-H1, a protein believed to control the dynamin-dependent fission of endocytic vesicles (18). These different observations have clarified the molecular basis of the role of Arf6 in clathrin-dependent and -independent endocytosis. Arf6 has been shown to be involved in the internalization of

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1401186111

different cargos, such as  $\beta 1$  integrin, E-cadherin, MHC class I, G protein-coupled receptors, and poly-Ig receptor (19–22). Moreover, EFA6, the Arf6 specific exchange factor, has been shown recently to activate Arf6 in response to  $\beta 2AR$  stimulation in a  $\beta$ -arrestin-dependent manner (23). This ligand-mediated activation of Arf6 couples stimulation and Arf6-dependent trafficking of the G protein-coupled receptor. In addition to its role in internalization, Arf6 also seems to be required for the recycling of the transferrin receptor (Tfn-R) via two effectors, JIP3/4 (24) and the Sec10 subunit of the exocyst (25), and the recycling of the  $\beta 2AR$ , probably through Rab4 activation (23). Also, Arf6 has been involved in the recycling of the IL2 receptor  $\alpha$ -subunit, syndecan, integrin  $\beta 1$ , and MHC class I (19, 26–28).

EFA6 belongs to the Sec7 domain-containing protein family that acts as guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Arf proteins (reviewed in ref. 29). In humans, the EFA6 protein family contains four isoforms, and shares a common domain organization consisting of a Sec7 domain bearing the catalytic activity, a pleckstrin homology domain responsible for the plasma membrane localization by interacting with PIP<sub>2</sub> and F-actin, a C-terminal region containing a putative coiled-coil motif and two proline rich motifs responsible for F-actin reorganization, and an N-terminal domain of unknown function whose size and primary sequence are the least conserved across the four isoforms. EFA6 is highly selective for Arf6, and is known to coordinate plasma membrane trafficking with actin cytoskeleton remodeling (30). EFA6 interacts directly

#### Significance

The small G protein ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) and the exchange factor for Arf6 (EFA6) are involved in endocytic vesicular transport, but their precise functions remain unclear. The Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) domain containing endophilin is known to couple fission to uncoating of the clathrin-coated vesicles. Here, we identified endophilin as a direct interactor of EFA6. We analyzed in vitro the effect of this interaction on EFA6 guanine nucleotide exchange factor activity, and on endophilin lipid binding and remodeling activities. We then studied in vivo the role of the two proteins in transferrin receptor endocytosis. Our results suggest a model in which EFA6 recruits endophilin on flat areas of endocytic zones of the plasma membrane, where endophilin cooperates with EFA6 to activate Arf6 and regulate clathrin-mediated endocytosis.

Author contributions: F.L. and M.F. designed research; S.B., E.M., M.P., and S.L.-G. per formed research; S.B., E.M., F.B., F.L., and M.F. analyzed data; M.F. wrote the paper. The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submissi

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: franco@ipmc.cnrs.fr. This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10 1073/pnas.1401186111//DCSupplemental.

PNAS | July 1, 2014 | vol. 111 | no. 26 | 9473-9478

with F-actin (31) and  $\alpha$ -actinin (32), and its overexpression leads to the formation of F-actin rich microvilli at the plasma membrane (30, 33). EFA6 is involved in the endocytic/recycling transport of several membrane proteins such as the Tfn-R,  $\beta$ 2AR and K<sup>+</sup> channel Twik1, and in the assembly of the tight junction in epithelial cells (23, 34–36). However, even though EFA6 functions are starting to be uncovered, little is known regarding its regulation.

Endophilins are members of the large and heterogeneous family of Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) domain proteins. They are encoded by endophilin 1–3 (i.e., A1-3) and B1-2 genes (reviewed in ref. 37). They function in synaptic vesicle recycling, membrane receptor trafficking, and different processes that require membrane remodeling. Endophilin BAR domain is part of the N-BAR subfamily (that contains an N-terminal amphipathic helix) that folds into a crescent-shaped dimer able to sense membrane curvature in vitro and to induce the deformation and tubulation of liposomes (reviewed in refs. 38, 39). The N-terminal BAR domain of endophilin is followed after a short linker by a C-terminal SH3 domain. This SH3 domain has been shown to bind dynamin and synaptojanin, two proteins involved in endocytic vesicle scission and uncoating, respectively (40–42). Although endophilin has been extensively investigated in vitro, its precise role in the cell has yet to be clarified.

To unravel at the molecular level the function of the EFA6/Arf6 pathway in membrane trafficking, we have looked for new partners of EFA6. Here, we identified the endophilin N-BAR domain as a direct interactor of the EFA6A Sec7 domain. We analyzed in vitro the effect of this interaction on the GEF activity of EFA6A, and on the lipid binding and remodeling activities of endophilin. We then studied in vivo the role of the two proteins in the endocytosis of the Tfn-R. Our results suggest a model in which EFA6 recruits endophilin on flat areas of endocytic zones of the plasma membrane, where endophilin cooperates with EFA6 to activate Arf6 and to regulate clathrin-mediated endocytosis.

#### Results

**Endophilin Interacts with EFA6A.** To uncover regulators of the nucleotide exchange factor activity of EFA6A, we performed a yeast two-hybrid screen by using its catalytic Sec7 domain as a bait. We identified several clones encoding for endophilin B1. GST pull-down experiments using lysates from transfected cell confirmed the interaction and showed that EFA6A could interact with endophilin A1, A2, and B1 isoforms (Fig. S1). From these experiments, we concluded that EFA6A interacts with members of the two endophilin subfamilies A and B.

Endophilin Directly Interacts with EFA6A and Stimulates Its Nucleotide Exchange Activity for Arf6. Next, we used purified recombinant proteins and different constructs of endophilin A1 (Fig. 1A) to show that His-EFA6A interacts directly with the first 125 aa of the N-BAR domain (1/2-N-BAR; Fig. 1B), known to retain the activity of lipid binding and tubule formation (43). As the Sec7 domain of EFA6A was used as bait in the two-hybrid screen, we confirmed that the purified recombinant Sec7 domain interacted with the GST-N-BAR (Fig. IC). Moreover, we observed that the deletion of the N-terminal helix (residues 1–36) of the N-BAR did not abolish the interaction with the Sec7 domain (Fig. 1D). Considered together, these data demonstrated a direct and specific binding of the Sec7 domain of EFA6A to a subdomain (residues 36–125) of the N-BAR domain of endophilin. We then studied the specificity of the interaction by using two other purified BAR domain-containing proteins. In contrast to GSTendophilin, neither GST-arfaptin nor GST-amphiphysin were able to interact directly with His-EFA6ASec7 (Fig. S2). It suggests that the primary sequence, together with the 3D structure, is responsible for the interaction with EFA6A-Sec7 domain.

9474 | www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1401186111



Fig. 1. Endophilin directly interacts with EFA6 and stimulates its GEF activity on Arf6. (A) Schematic representation of endophilin A1 and the different GST constructs used in this study. (*B* and C) GST pull-down of purified Histagged EFA6A (*B*) or EFA6A-Sec7 domain (C) by different constructs of endophilin A1 fused to GST. (*D*) GST pull-down of purified His-tagged N-BAR or AN-BAR domain by EFA6-Sec7 domain fused to GST. (*E*) Kinetics of [<sup>35</sup>S] GTP<sub>7</sub>S binding to purified and myristoylated Arf6 (2  $\mu$ M) were measured (*Methods*) in the presence of phospholipid vesicles and in the presence or the absence of purified His-tagged EFA6A (-200 nM) and endophilin A1 fused to GST (2  $\mu$ M). The results are representative of at least three independent experiments.

As endophilin interacted with the catalytic Sec7 domain, we investigated whether it could modulate the GEF activity of EFA6A on Arf6. We examined in vitro the kinetics of the spontaneous and His-EFA6A catalyzed Arf6 activation in the presence or absence of GST-endophilin (Fig. 1*E*). We carried out our assay in conditions closest to normal physiology; that is, at the surface of large liposomes and by using myristoylated Arf6. The presence of endophilin did not affect the spontaneous activation of Arf6, whereas it strongly stimulated that catalyzed by EFA6A. These results suggested first that EFA6A binds simultaneously Arf6 and endophilin, and second that, by interacting directly with the Sec7 domain, the endophilin acts as a positive regulator of the GEF activity.

The EFA6A-Sec7 Domain Competes with Lipids to Bind the N-BAR Domain. As N-BAR domains are essentially known to interact with curved lipid membranes, we examined whether the Sec7 domain could affect the binding of endophilin N-BAR domain to lipid vesicles of different sizes. To evaluate in a direct manner

Boulakirba et al.



Fig. 2. EFA6-Sec7 domain and highly curved lipid membranes compete to bind endophilin N-BAR domain. (A) Flotation assay. EFA6A-Sec7 fused to GST (1.5  $\mu$ M) or His-tagged endophilin N-BAR (4  $\mu$ M) or a mixture of the two proteins were incubated with small (50 nm) or large (400 nm) phospholipid liposomes (1 mM). The sample suspension was adjusted to 30% sucrose and then overlaid with two cushions of decreasing sucrose density (*Methods*). After centrifugation, the top (lipids and associated proteins) and bottom (unbound material) fractions were analyzed by SDS/PAGE. Proteins were stained with SYPRO Orange. (*B*) GST pull-down of purified His-tagged EFA6A by endophilin A1 fused to GST in the absence or the presence of small (50 nm) or large (400 nm) liposomes. The results shown are representative of at least three independent experiments.

the binding of endophilin N-BAR and EFA6A-Sec7 to liposomes, we used a flotation assay in which the lipids and the associated proteins are recovered by centrifugation at the top of a sucrose gradient. We tested two sizes of liposomes: large liposomes with a diameter of ~0.4  $\mu$ m mimicking flat membranes, and small liposomes (~0.05  $\mu$ m in diameter) simulating endocytic vesicles. Although the affinity of the N-BAR is known to be higher for curved membranes, in our conditions, we found the N-BAR to be associated with both kinds of vesicles, whereas, as expected, the Sec7 domain did not bind to either liposomes (Fig. 24). Surprisingly, in the presence of the Sec7 domain, the N-BAR was found to be associated only with small liposomes, indicating that the Sec7 domain inhibited the binding of the N-BAR to the large liposomes. These data demonstrated that the endophilin N-BAR could not interact simultaneously with lipid membranes and EFA6A-Sec7. These results were strengthened by a GST pulldown experiment using purified recombinant proteins in the presence of liposomes. Fig. 2*B* shows that GST-endophilin recovered EFA6A even in the presence of large liposomes (~0.4  $\mu$ m). However, in the presence of small vesicles (~0.5  $\mu$ m), GSTendophilin was not able to retain EFA6A (Fig. 2*B*). Overall, these data demonstrated that the EFA6A-Sec7 domain

Overall, these data demonstrated that the EFA6A-Sec7 domain competes with lipids for binding to the N-BAR. Furthermore, they demonstrated that, under our experimental conditions, highly curved lipid membranes dissociate the EFA6A-Sec7/N-BAR complex, whereas the Sec7 domain disrupts the interaction of N-BAR with flat membranes. In other words, the interaction between EFA6 and endophilin is regulated by the membrane curvature.

The Endophilin N-BAR-Induced Deformation and Tubulation of Large Liposomes Is Inhibited by the EFA6A-Sec7 Domain. We then asked whether EFA6A-Sec7 could affect the function of the endophilin N-BAR by looking at its ability to induce the deformation and

Boulakirba et al.

tubulation of liposomes. By dynamic light scattering, it is possible to determine the radius [i.e., hydrodynamic radius (Rh)] of the liposomes in solution. Fig. 3A shows that the presence of the N-BAR (Fig. 3A, blue diamonds) induced an increase over time of the Rh of large (Fig. 3A, *Left*) and small (Fig. 3A, *Right*) lipid vesicles in comparison with vesicles alone (Fig. 3A, yellow triangles), verifying that the N-BAR affects the form and the size of the liposomes. We used negative stain EM to visualize the change of size and to determine the nature of the deformation. As shown in Fig. 3B, a 20-min incubation of purified N-BAR domain with large liposomes led to a strong tubulation of nearly all liposomes, which then disappeared or became much smaller (Fig. 3B, *Center*). Interestingly, we observed that the addition of the Sec7 domain (Fig. 3B, pink squares) inhibited the N-BAR-dependent increase of the Rh of only the large liposomes (Fig. 3A). This result was confirmed by EM analysis. When the Sec7 and the N-BAR domains were added to the large lipid vesicles, only few tubules were formed, and numerous liposomes looked similar to the control ones in terms of size and shape (Fig. 3B, *Right*). Thus, collectively, these results indicated that EFA6A-Sec7,

Thus, collectively, these results indicated that EFA6A-Sec7, by interacting with the endophilin N-BAR, inhibits its ability to generate membrane curvature. However, when membrane curvature is high, the Sec7 does not interfere with N-BAR– dependent tubulation. These observations confirmed that the Sec7 domain could not displace the complex of the N-BAR domain with highly curved membrane.

**EFA6A Induces the Recruitment of Endophilin to the Plasma Membrane.** We then investigated the biological function of the EFA6/ endophilin interaction. First, we examined the localization of both proteins in HeLa cells by immunfluorescence. As previously published (30, 31), EGFP-EFA6A localized essentially to the plasma membrane, and particularly in membrane ruffles and F-actin-rich microvilli-like structures induced upon its expression (Fig. 44). In contrast, myc-tagged endophilin A2 was found



Fig. 3. EFA6-Sec7 inhibits the endophilin N-BAR-induced aggregation and tubulation of large liposomes. (A) Effect of His N-BAR and GST-EFA6A-Sec7 on the aggregation and tubulation of liposomes. Large (400 nM, *Left*) or small (50 nM, *Right*) liposomes incubated alone (yellow triangles) or in the presence of His-N-BAR (blue diamonds) or His-N-BAR and GST-EFA6A-Sec7 (pink squares) were analyzed in real time by dynamic light scattering (*Methods*). (B) EM image of large liposomes (400 nm) incubated alone (*Left*) or in the presence of His-N-BAR (*Center*) or His-N-BAR and GST-EFA6A-Sec7 (*Right*). (Scale bar, 1  $\mu$ M.) The results shown are representative of three separate experiments.

PNAS | July 1, 2014 | vol. 111 | no. 26 | 9475

BIOCHEMISTRY



Fig. 4. Coexpression with EFA6 induces the redistribution of endophilin to the plasma membrane. BHK-21 cells were transfected with EGFP-EFA6A (A) or with myc-endophilinA2 (B) or both (C and D). After fixation, the cells were processed for immunofluorescence (*Methods*). The images shown are representative of at least five separate experiments.

mostly in the cytoplasm (Fig. 4B). When the proteins were coexpressed (Fig. 4 C and D), we noticed that a large portion of endophilin was found in EFA6A-positive structures of the plasma membrane, suggesting that EFA6A recruits endophilin to the plasma membrane. It should be noted that the EFA6A-induced structures were not affected by the presence of endophilin. Thus, the direct interaction described in vitro between the Sec7 domain of EFA6A and the N-BAR domain of endophilin could account for the EFA6A-mediated recruitment of endophilin to the plasma membrane. Furthermore, in light of our in vitro results, the interaction should preferentially occur in flat zones of the plasma a novel EFA6-interacting protein at the plasma membrane.

Endophilin Rescues the EFA6A-Induced Inhibition of Transferrin Internalization. We have previously shown that the overexpression of EFA6A inhibited Tfn uptake and caused redistribution of the Tfn-R to the cell surface by an unknown mechanism (30). In light of our new results described here, and because endophilin is known to be a key regulator of clathrin-dependent endocytosis, one explanation could be that the overexpressed EFA6A inhibited the formation of endocytic vesicles, and thereby Tfn internalization, by sequestering the endogenous endophilin on flat regions of the plasma membrane. To test this hypothesis, we examined the in-ternalization of fluoresceinated human Tfn in TRV-b1 cells [a CHO-derived cell overexpressing the human Tfn-R (44)] expressing EFA6A, endophilin A2, or both (Fig. 5). In untransfected cells, Tfn internalized for 3 min was found throughout the cells in small vesicular structures known to be early endosomes (Fig. 5A, Left), whereas, after 30 min, it was mostly accumulated in a single large patch in the pericentriolar area known to be the endocytic recycling compartment (Fig. 5A, Right). As previously published, we observed that overexpression of endophilin A2 had no effect on the rate of Tfn internalization. In contrast, overexpression of EFA6A strongly inhibited Tfn uptake as strongly at 3 min as at 30 min, with a ~50% inhibition being measured (Fig. 5). However, when cells were cotransfected with EFA6A and endophilin, they internalized Tfn similarly to untransfected or endophilin expressing cells (Fig. 5). Thus, overexpression of endophilin rescued the inhibition of the Tfn uptake mediated by EFA6A.

Altogether, these results showed that EFA6A and endophilin are part of the same pathway that controls Tfn-R internalization.

#### Discussion

In this study, we identified and characterized a direct interaction of EFA6, the Arf6-specific exchange factor, with endophilin, a protein involved in clathrin-coated vesicle formation. This interaction, which is, to our knowledge, the first described between an ArfGEF and an N-BAR–containing protein, clearly reinforces the link between the EFA6/Arf6 pathway and endocytic vesicular transport.

Until now, the factors that trigger endophilin recruitment to the membrane have been unknown. Here, we observed that endophilin A2 and B1, representative members of the two endophilin subfamilies that are normally found diffused throughout the cytosol, are strongly recruited to the specific EFA6-enriched domains of the plasma membrane when coexpressed with EFA6. This observation indicates that EFA6 contributes to the plasma membrane localization of endophilin. Thus, our results identified and characterized EFA6 as one of the factors that recruit endophilin to the plasma membrane.

Nevertheless, the EFA6/endophilin interaction is probably not constitutive. Besides the membrane curvature that induces the dissociation of the Sec7/N-BAR complex, other regulatory signals must exist to control this interaction. A better understanding of the EFA6/endophilin pathway will require the identification of the signals and the molecular mechanisms that regulate in time and space the formation of the complex. It has been proposed that phosphorylation of a couple of sites in the N-BAR domain could modulate the endocytic function and membrane binding properties of endophilin (ref. 45; reviewed in ref. 37). It will be of interaction of the N-BAR domain with EFA6.

Numerous proteins involved in intracellular vesicular transport have been shown to interact with phospholipid membranes in a membrane curvature-dependent manner. This dependency is given by sensor domains such as amphipathic helix, Alps motif, BAR domain. However, to our knowledge, we have now characterized for the first time a protein–protein interaction that is



Fig. 5. Expression of endophilin rescues the EFA6-induced inhibition of transferrin uptake. (A and B) TRVb-1 cells expressing EGFP-EFA6, myc-endophilin A2, or both were incubated at 37 °C for 3 min (*Left*) or 30 min (*Right*) with iron-saturated Texas red-conjugated human transferrin, fixed, and processed for immunofluorescence (A). Arrowheads indicate the transfected cells. Internalized transferrin was equantified (B) as described in *Methods* and normalized to the amount of internalized transferrin in untransfected cells in each condition (error bars represent SEM, *n* indicates the number of analyzed cells). Statistical analysis was performed by Student t test. ns, not significant, i.e., P > 0.1 (\*\*\*P < 0.001).

9476 | www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1401186111

Boulakirba et al.

controlled by membrane curvature. According to our in vitro results, the recruitment of endophilin by EFA6 will occur only on flat areas of the plasma membrane. Indeed, the interaction between the catalytic Sec7 domain of EFA6 and the lipid-binding N-BAR domain of endophilin was down-regulated by the membrane curvature. Also, it implies that the Sec7 domain binding site is located in the concave face of the endophilin N-BAR that is known to interact with the lipid membranes (46).

What could be the function of this EFA6-induced plasma membrane recruited endophilin? Here we demonstrated that endophilin binds to the catalytic Sec7 domain to simulate Arf6 activation. Endophilin constitutes the first activator of the catalytic activity of EFA6 by directly interacting with its Sec7 domain. We have previously reported that in response to isoproterenol, a  $\beta 2$  adrenergic receptor agonist,  $\beta$ -arrestin was able to stimulate the EFA6-mediated activation of Arf6. However, this stimulation occurs probably by a different mechanism from that used by endophilin. Indeed,  $\beta$ -arrestin interacts simultaneously with EFA6 and Arf6GDP to corecruit the GEF and its substrate. Thus, β-arrestin stimulates Arf6 activation by reducing the dimensionality. An interaction with the N-BAR domain of arfaptin has been reported with Arf and Arl proteins (47, 48). However, we did not observe a direct interaction of Arf6 with endophilin. Thus, we hypothesize that endophilin modulates the GEF activity of EFA6 by affecting the 3D structure of the Sec7 domain, or by affecting the overall structural organization of the protein, leading to an increase in its affinity for Arf6. Structural analysis would be required to identify precisely the binding site and the mechanism by which endophilin enhances the GEF activity.

Regardless of the mechanism, the endophilin recruited to the plasma membrane by EFA6 would increase the pool of activated Art6GTP. However, this stimulatory effect would occur only in the absence of a highly curved membrane. Indeed, we observed dissociation of the Sec7/N-BAR complex in the presence of small lipid vesicles, suggesting a chronological sequence of events. First, EFA6 would recruit endophilin to a flat zone of the plasma membrane, where both proteins would cooperate to activate Art6. A high concentration of Art6GTP will then activate the type I PIP5Kinase, recruit AP-2 and the clathrin molecules to shape the membrane, and build the clathrin pits. The increasing membrane curvature of the clathrin-coated vesicle will then produce the dissociation of the Sec7/N-BAR complex, releasing the endophilin, which can then assume its functions in endocytic vesicle fission and uncoating.

In addition, it is intriguing that EFA6 was found to interact directly or indirectly (via adaptors) with cargos and regulate their intracellular distribution. We previously demonstrated that EFA6 binds to the stimulated  $\beta$ 2AR through  $\beta$ -arrestin to control its intracellular fate (23). We have also established that EFA6 interacts directly with TWIK-1, a K<sup>+</sup> channel, to govern its distribution between the plasma membrane and the recycling endosomes (36). From these observations, we propose that EFA6 acts as a platform to connect the cargo to the endocytic molecular machinery, notably by controlling directly different steps from coat assembly to vesicle scission.

We observed that EFA6 can interact with the three different isoforms that we have tested, namely endophilin A1, A2, and B1. Endophilins A1 and A2 are known to act in the final stages of endocytosis by recruiting dynamin and synaptojanin for clathrin vesicle fission and uncoating, respectively. This suggests that EFA6 and Arf6 may be involved in the control of clathrin-dependent endocytosis. A role that is in agreement with their principal localization at the plasma membrane, with the effect of their overexpression on transferrin internalization, and with the capability of Arf6 to stimulate PIP2 formation and AP-2 recruitment. Endophilin B1 (which shares approximately 30% identity with A1) also exhibits lipid binding and liposome tubulation properties. However, in contrast to the A isoforms,

Boulakirba et al.

B1 is found associated with intracellular organelles, and particularly with early endosomes, in which it colocalizes and forms a complex with EEA1. In addition, B1 has been involved in the recycling of the neurotrophin nerve growth factor (i.e., NGF/ TrkA; reviewed in ref. 49). Although we have never found EFA6 localized to early endosomes, there is much evidence for involvement of Arf6 in receptor recycling. Arf6 has been involved in the recycling of different receptors (e.g., Tfn receptor,  $\beta$ 2AR, IL-2 receptor) and intracellular EEA1-positive staining has also been reported for activated Arf6 (23, 27). One cannot exclude that EFA6 participates in endophilin B1 function at the early endosome level, and further studies are required to analyze such a role in receptor recycling.

In summary, our results indicate that EFA6 and endophilin act as key regulators of receptor-mediated endocytosis, and cooperate to regulate clathrin-dependent endocytosis.

#### Methods

DNA Constructs. Sequences encoding residues 1–125 (1/2-N-BAR), 1–256 (N-BAR), and 290–352 (5H3) of mouse endophilin A1 were obtained by PCR and cloned into pGEX-3X (GE Healthcare) for in-frame fusion with GST at the N terminus. Sequences encoding residues 1–256 (N-BAR) and 36–256 (AN-BAR) of mouse endophilin A1 were obtained by PCR and cloned into pET16b (Novagen) for in-frame fusion with hexa-His tag at the N terminus. Plasmids encoding vsv-g-tagged EFA6A, EGFP-EFA6A, His-EFA6A, His-EFA6A, His-EFA6A, SG7T-EFA6A, GST-EFA6A, Sec7, and His-Arf6 have been described elsewhere (30, 33, 50). pcDNA3 myc-tagged mouse endophilin A2, pcDNA3 myc-tagged human endophilin B1, and pGEX-6p-mouse endophilin A1 were provided by A. Schmidt (Institut Jacques Monod, Paris, France). pGEX-human arfaptin-2 and pGEX-human amphiphysin II were provided by P. De Camilli (Yale University, New Haven, CT).

Expression and Purification of Recombinant Proteins. For the in vitro binding assays, recombinant myristoylated Arf6 WT with a C-terminal hexa-his tag (MyrArf6) was prepared as described elsewhere (25, 51, 52). Recombinant his-tagged EFA6A (His-EFA6A) was prepared as previously described (31). The different GST fusion proteins were produced in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography on glutathione.-Sepharose beads (GE Health-care). After elution with glutathione, the purified proteins were dialyzed against 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, and 10% glycerol (dialysis buffer), and stored at -20 °C. Recombinant His-tagged N-BAR and ΔN-BAR domains were expressed in *E. coli* and purified according to the manufacturer's instructions (Qiagen).

Internalization of Texas Red-Conjugated Transferrin. TRVb-1 cells plated on 11-mm round glass coverslips were transiently transfected with plasmids encoding EGFP-tagged EFA6A and myc-tagged endophilin A2 as indicated, by using the Jet Pei transfection reagent as described by the manufacturer. Twenty-four hours after transfection, cells were preincubated in serum-free medium containing 1% BSA for 30 min at 37 °C, and then incubated for 3 or 30 min in the same medium supplemented with 50 µg/mL of Texas red-conjugated human transferrin (Molecular Probes/Fisher Scientific). Cells were then washed twice in ice-cold PBS solution, fixed in 3% (wtt/v0) paraformaldehyde, and processed for immunofluorescence analysis as described previously (53). The confocal images obtained from the laser scanning confocal microscope (TCS SPS; Leica Microsystems) were analyzed to quantify the transferrin uptake by using a homemade Image (http://magej.nih.gov/ij/) macro program (W. S. Rasband). Briefly, each cell contour was determined on images corresponding to EGFP-EFA6A-expressing cells, and all the others on Texas red transferrin images by segmentation (filtering and thresholding followed by a watershed on the binary image and detection of the objects). The cumulated surface and intensities of the intracellular transferrin gnaules and their number were determined in both populations

ACKNOWLEDGMENTS. The authors thank Drs. Anne Schmidt (Institut Jacques Monod) and Pietro De Camilli (Yale University) for advice and the gift of various DNA constructs, and Dr. D. Debayle for mass spectrometry analysis. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the National Research Agency (ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE Program Reference ANR-11-LABX-0028-01.

PNAS | July 1, 2014 | vol. 111 | no. 26 | 9477

- 1. D'Souza-Schorey C, Chavrier P (2006) ARF proteins: Roles in membrane traffic and beyond, Nat Rev Mol Cell Biol 7(5):347-358
- Donaldson JG, Jackson CL (2011) ARF family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(6):362–375.
   Donaldson JG, Cassel D, Kahn RA, Klausner RD (1992) ADP-ribosylation factor, a small
- GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes. Proc Natl Acad Sci USA 89(14):6408-6412.
- Palmer DJ, Helms JB, Beckers CJ, Orci L, Rothman JE (1993) Binding of coatomer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. J Biol Chem 268(16):12083–12089.
   Zhao L, et al. (1997) Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit beta. Proc Natl Acad Sci USA 94(9):4418–4423.
- 6 Stames MA, Rothman JE (1993) The binding of AP-1 (athrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell* 2023 (2014) 2023
- 73(5)-999-1005 Traub LM, Ostrom JA, Kornfeld S (1993) Biochemical dissection of AP-1 recruitment onto Golgi membranes. J Cell Biol 123(3):561-573.
- 6. Puertollano R, Randazzo PA, Presley JF, Hartnell LM, Bonifacino JS (2001) The GGAs promote ARF-dependent recruitment of clathrin to the TGN. *Cell* 105(1):93–102.
  9. Brown HA, Guttowski S, Moomav CR, Slaughter C, Sternweis PC (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell*
- 75(6):1137-1144 10. Cockcroft S, et al. (1994) Phospholipase D: A downstream effector of ARF in gran-
- ulocytes. Science 263(5146):523-526.
- Godi A, et al. (1999) ARF mediates recruitment of Ptdlns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of Ptdlns(4,5)P2 on the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 1(5):280–287.
   Massenburg D, et al. (1994) Activation of rat brain phospholipase D by ADPribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent
- and oleate-dependent ensystems. Proc Natl Acad Sci USA 91(24):11118–11722. Caumont AS, Galas MC, Vitale N, Aunis D, Bader MF (1998) Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. J Biol Chem 273(3):1373–1379.
- Béglé A, Tryoen-Tóth P, de Barry J, Bader MF, Viale N (2009) ARF6 regulates the synthesis of fusogenci lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 284(8):4836–4845.
- 15. Krauss M, et al. (2003) ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic branes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. J Cell Biol 162(1):113-124
- Honda A, et al. (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a down-stream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. Cell 99(5): 521-532.
- 17. Paleotti O, et al. (2005) The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor
- Paleotti O, et al. (2005) The small G-protein ArtbolP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *J Biol Chem* 2080(2):21661–21666.
   Palacios F, Schweitzer JK, Boshans RL, D'Souza-Schorey C (2002) ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions dis-assembly. *Nat Cell Biol* 41(2):929–936.
   Radhakrishna H, Donaldson JG (1997) ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel
- plasma membrane recycling pathway. J Cell Biol 139(1):49–61.
   Houndolo T, Boulay PL, Claing A (2005) G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. J Biol Chem 28(07):5598–5604.
   Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG (2001) Phosphatidylinositol 4,5-
- bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. J Cell Biol 154(5):1007-1017
- Disprospinate and Arto-regulated memorane traffic. J Cell Biol 154(5):1007-1017.
   Altschuler Y, et al. (199) ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. J Cell Biol 147(1):7-12.
   Macia E, Partisani M, Paleotti O, Luton F, Franco M (2012) Artfo negatively controls the rapid recycling of the fig: 2 adrenergic receptor. J Cell Sci 125(pt 17):4026-4035.
   Montagnac G, et al. (2009) ARF6 Interacts with JIP4 to control a motor switch
- Montagnac G, et al. (2009) Akrb Interacts with JIP4 to control a motor switch mechanism regulating endosome traffic in cytokinesis. *Curr Biol* 19(3):184–195.
   Prigent M, et al. (2003) ARF6 controls post-endocytic recycling through its down-stream exocyst complex effector. *J Cell Biol* 163(5):1111–1121.
   Zimmerman P, et al. (2005) Syndecan recycling [corrected] is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. *Dev Cell* 9(3):377–388.
- 27. Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG (2003) Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinosi-
- es involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinosi-clathrin-derived endosomes involves Art6 inactivation and changes in phosphoinosi-tides. *Mol Biol Cell* 14(2):417–431.
   28. Powelka AM, et al. (2004) Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regu-
- lated by ARF6 and Rab11. Traffic 5(1):20-36

- 29. Casanova JE (2007) Regulation of Arf activation: The Sec7 family of guanine nucle
- Chantor JP, Goron Hogardon of Art Jotechin May Statistical International Internatinternational International Internationa Internationa Internat 1480-1491.
- 31. Macia E, et al. (2008) The pleckstrin homology domain of the Arf6-specific exchange Maca E, et al. (2006) The pressum homology domain of the Arlospectric exchange factor EFA6 localizes to the plasma membrane by interacting with phosphatidylino-sitol 4,5-bisphosphate and F-actin. J Biol Chem 283(28):19836–19844.
   Sakagami H, et al. (2007) Somatodendritic localization of EFA6A, a guanine nucleo-
- tide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6, and its possible interaction with
- Derrien V, et al. (2002) A conserved C-terminal domain of EFA6-family ARF6-guanine nucleotide exchange factors induces lengthening of microvilli-like membrane pro-trusions. *J Cell Sci* 115(Pt 14):2867–2879.
- Luton F, et al. (2004) EFA6, exchange factor for ARF6, regulates the actin cytoskeleton and associated tight junction in response to E-cadherin engagement. *Mol Biol Cell* 15(3):1134–1145.
- 35. Klein S, Partisani M, Franco M, Luton F (2008) EFA6 facilitates the assembly of the tight junction by coordinating an Arf6-dependent and -independent pathway. J Biol
- Chem 283(44):30129–30138. 36. Decressac S, et al. (2004) ARF6-dependent interaction of the TWIK1 K+ channel with EFA6, a GDP/GTP exchange factor for ARF6. EMBO Rep 5(12):1171-1175
- Kjaerulff O, Brodin L, Jung A (2011) The structure and function of endophilin proteins. *Cell Biochem Biophys* 60(3):137–154.
   Peter BJ, et al. (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: The amphiphysin BAR structure. *Science* 303(5657):495–499.
- 39. Itoh T, De Camilli P (2006) BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the requ-
- of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. Biochim Biophys lation Acta 1761(8):897–912 . Sundborger A, et al. (2011) An endophilin-dynamin complex promotes budding of
- dathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J Cell Sci* 124(PT 1):133–143.
   Ringstad N, et al. (1999) EndophilinSH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 24(1):143–154.
   Micheva KD, Kay BK, McPherson PS (1997) Synaptojanin forms two separate com-
- plexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. J Biol . Chem 272(43):27239–27245.
- Farsad K, et al. (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol* 155(2):193–200.
   McGraw TE, Greenfield L, Maxfield FR (1987) Functional expression of the human
- transferrin receptor cDNA in Chinese hamster ovary cells deficient in endogenous
- transferrin receptor. J Cell Biol 105(1):207–214. Kaneko T, et al. (2005) Rho mediates endocytosis of epidermal growth factor receptor through phosphorylation of endophilin A1 by Rho-kinase. Genes Cells 10(10): 45. I 973-987
- Gallop JL, et al. (2006) Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J* 25(12):2898–2910.
   Tarricone C, et al. (2001) The structural basis of Arfaptin-mediated cross-talk between
- Rac and Arf signalling pathways. Nature 411(6834):215-219. 48. Nakamura K, et al. (2012) Structural basis for membrane binding specificity of the Bin/
- AmphiphysinRvs (BAR) domain of Arfaptin-2 determined by Ar11 GTPase. *J Biol Chem* 287(30):25478–25489. Cheung ZH, Ip NY (2009) Endophilin B1: Guarding the gate to destruction. Commun
- Integr Biol 2(2):130–132.
   Macia E, Chabre M, Franco M (2001) Specificities for the small G proteins ARF1 and ARF6 of the guanine nucleotide exchange factors ARNO and EFA6. J Biol Chem December 2012 patients
- 276(27):24925-24930. 51. Franco M, Chardin P, Chabre M, Paris S (1995) Myristoylation of ADP-ribosylation factor 1 facilitates nucleotide exchange at physiological Mg2+ levels. J Biol Chem 270(3):1337–1341.
- 52. Chavrier P, Franco M (2001) Expression, purification, and biochemical properties of
- Chaviter P, Franco M (2001) Expression, purification, and Discretenical properties of EFA6, a SeC domain-containing guaranie exchange factor for ADP-ribosylation factor 6 (ARF6). Methods Enzymol 329:272–279.
   Franco M, et al. (1998) ARNO3, a Sec7-domain guaranie nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and func-tion. Proc Natl Acad Sci USA 95(17):9926–9931. 53

9478 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1401186111

# **Supporting Information**

#### Boulakirba et al. 10.1073/pnas.1401186111 SI Methods

Cell Culture, Reagents, and Antibodies. HeLa cells were grown in HeLa media corresponding to DMEM (Invitrogen) containing 10% FCS (HyClone/Thermo Fisher Scientific), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen). TRVb-1 cells were grown in Ham F-12 medium (Invitrogen), 5% FCS, penicillin/ streptomycin, and 100 µg/mL G418 (Invitrogen). The following were obtained from Jackson ImmunoResearch: mouse mAb against vsv-g epitope (clone P5D4; Roche Diagnostics), mouse mAb against His epitope (Sigma-Aldrich), mouse mAb against myc epitope (clone 9E10; Roche Diagnostics), FITC and Texas red conjugated antibodies. Iron-loaded Texas red-conjugated human transferrin was from Molecular Probes/Fisher Scientific. Asolectin, unlabeled nucleotides, and egg dioleyl-phosphatidylcholine were from Sigma. Liver phosphatidylethanolamine and brain phospha-tidylserine were from Avanti Polar Lipids. [<sup>35</sup>S]GTPγS was from Perkin-Elmer.

GST Pull-Down Experiments. HeLa cells were mock-transfected or transfected with plasmids encoding myc-tagged endophilin B1, myc-tagged endophilin A2, and vs-g-tagged exchange factor for Arf6 (EFA6) as indicated by using Jet Pei reagent. After 24 h, cells were lysed in 50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 1% Triton-X100, 2 mM DTT, and a mixture of protease inhibitors (Roche Diagnostics), and centrifuged at  $15,000 \times g$  for 10 min at 4 °C. Supernatants were incubated with 0.25 mM GST constructs in the presence of 0.75% BSA and glutathione-Sepharose beads overnight at 4 °C.

For direct binding assay with purified recombinant proteins,  $0.05-0.15 \mu$ M His fusion proteins containing various fragments of endophilin or EFA6 as indicated were incubated in 50 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 2 mM DTT, and a mixture of protease inhibitors with 0.25  $\mu$ M GST constructs with or without 0.5 mM liposomes in the presence of 0.75% BSA and glutathione-Sepharose beads for 2 h 30 min at 4 °C.

Beads were washed, and bound proteins were eluted by using SDS sample buffer and separated on SDS/PAGE. The presence of EFA6 and endophilin in the eluate was detected by Western blotting by using the anti-tag antibodies.

Confocal Immunofluorescence Microscopy. HeLa or  $TRVb\mathchar`le la set the transformation of transformation of the transformation of transformation of the transformation of transformatio$ plated on 11-mm round glass coverslips were transiently trans-fected with pcDNA3 or pEGFP-N1/C1 constructs by using the Jet-PEI transfection reagent (Polyplus Transfection) as described by the manufacturer. Unless otherwise stated, the cells were washed twice in PBS solution 24 h after transfection and then fixed in 3% paraformaldehyde and processed for immunofluorescence analysis as described previously (1). Confocal microscopy was carried out with a TCS-SP5 laser scanning confocal microscope (Leica Microsystems).

Franco M, et al. (1998) ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(7):9926–9931.
 Szoka F, Jr., Papahadjopoulos D (1978) Procedure for preparation of lipsomes with

large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proc Natl Acad Sci USA 75(9):4194-4198.

Preparation of Phospholipid Vesicles. Large unilamellar vesicles of asolectin were prepared as described elsewhere (2) and extruded through a 0.4- or 0.05-µM pore-size polycarbonate filter (Isopore; Millipore). Vesicles of defined composition (dioleyl-phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine/phosphatidylserine at 35/ 35/30 weight ratio) were prepared as previously described previously (3) at the concentration of 2 mg/mL.

[<sup>35</sup>S]GTP<sub>7</sub>S Binding Assay. MyrArf6 (2  $\mu$ M) was incubated at 30 °C with [<sup>35</sup>S]GTP<sub>7</sub>S (20  $\mu$ M; ~2,000 cpm/pmol) in 50 mM Hepes (pH 7.5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, with asolectin (2 mM) with or without (as indicated in the Fig. 1 legend) His-tagged EFA6A (0.5  $\mu$ M) and GST-endophilin (2  $\mu$ M). At the indicated times, samples of 25 µL were removed and measured for radioactivity as described previously (4).

**Flotation Experiments.** Proteins  $(1.5-4 \ \mu\text{M})$  and liposomes  $(1 \ \text{mM})$  were incubated in HK buffer (50 mM Hepes pH 7.2; 120 mM K-acetate) with DTT (1 mM) and MgCl<sub>2</sub> (0.5 mM) at room temperature for 20 min in a total volume of 150  $\mu$ L. The suspenses of the second pension was adjusted to 30% sucrose by adding and mixing 100  $\mu L$  of a 75% wt/vol sucrose solution in HK buffer. The resulting highsucrose suspension was overlaid with 200 µL HK containing 25% wt/vol sucrose and 50 µL HK containing no sucrose. The sample was centrifuged at 55,000 rpm (240,000  $\times$  g) in a swinging rotor (TLS 55; Beckman Coulter) for 1 h. The bottom (250 µL), middle (150  $\mu$ L), and top (50  $\mu$ L) fractions were manually collected from the bottom by using a Hamilton syringe, and analyzed by SDS-PAGE before and after staining with SYPRO Orange (Molecular Probes). The presence of proteins was detected by Western blot.

Dynamic Light Scattering. Measurements were made by using a Dynapro MSX instrument (Protein Solutions) equipped with a Peltier temperature controller. A 15- $\mu$ L solution of Hepes 50 mM, pH 7.2, K-acetate 120 mM, and MgCl<sub>2</sub> 1 mM containing His-N-BAR (2 µM), with or without asolectin liposomes (0.1 mg/mL) and GST-Sec7 (5  $\mu$ M) as indicated in Fig. 3, was placed in a quartz cuvette. After equilibration at 25 °C, 10 autocorrelation functions of the scattered light were determined at the optimal laser intensity, each for 10 s. From multiexponential fits of the autocorrelation functions, an intensity graph was produced, and the average size of particles represented (Dynamic V 5.0 software; Protein Solutions).

**EM.** Samples containing His-N-BAR  $(2\mu M)$  were incubated for 20 min at room temperature in HKM buffer (50 mM Hepes pH 7.5; 100 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>) with or without asolectin liposomes (0.1 mg/mL) and GST-Sec7 (5 µM). Samples were deposited on glow discharge carbon-coated grids and negatively stained with 1% aqueous uranyl acetate. They were observed with a JEOL 1400 transmission electron microscope. Acquisitions were made with a Morada digital camera (Olympus SIS).

Macia E, Paris S, Chabre M (2000) Binding of the PH and polybasic C-terminal domains of ARNO to phosphoinositides and to acidic lipids. *Biochemistry* 39(19):5893–5901.
 Franco M, Chardin P, Chabre M, Paris S (1995) Myristoylation of ADP-ribosylation factor.

facilitates nucleotide exchange at physiological Mg2+ levels. J Biol Chem 270(3) 1337-1341.



Fig. S1. Endophilin interacts with EFA6. (A) Schematic representation of the domain organization of EFA6A and endophilin B1. (B and C) GST pull-down of myc-tagged endophilin B1 (B) or A2 (C) expressed in HeLa cells by EFA6A fused to GST. (D) GST pull-down of vsv-g-tagged EFA6A expressed in BHK cells by endophilin A1 fused to GST. The results shown are representative of three independent experiments.



Fig. 52. EFA6A-Sec7 domain interacts specifically with GST-endophilin but not with GST-arfaptin 2, neither with GST-amphiphysin II. GST pull-down of purified His-tagged EFA6A-Sec7 domain using three BAR-domain containing proteins: endophilin A1, arfaptin 2, and amphiphysin II fused to GST. The results shown are representative of four independent experiments.

Boulakirba et al. www.pnas.org/cgi/content/short/1401186111

AS PNAS

2 of 2

### III. Résumé

Afin de confirmer les résultats obtenus en double hybride, nous avons réalisé des expériences de pull-down sur des lysats cellulaires sur-exprimant nos protéines d'intérêt. Nous avons pu observer qu'EFA6A interagit avec des isoformes représentants les deux familles d'endophiline, soit l'endophiline A1, l'endophiline A2 et l'endophiline B1. Nous avons pu mettre en évidence, par l'utilisation de protéines purifiées que cette interaction est directe et qu'elle se fait par l'intermédiaire du domaine Sec7 d'EFA6 et des 125 premiers acides aminés du domaine N-BAR de l'endophiline A1. Ces deux domaines étant importants pour les fonctions de ces deux protéines, nous avons ensuite étudié les effets de cette interaction sur leurs activités respectives. Nous avons observé qu'in vitro l'endophiline A1 stimule l'activité d'échange d'EFA6 sur de l'Arf6 myristylé en présence de vésicules de grande taille. Ces résultats suggèrent qu'EFA6 est capable de lier simultanément Arf6 et l'endophiline, et que par cette interaction l'endophiline joue un rôle de régulateur positif sur l'activité catalytique d'EFA6. Par des expériences de flottaison sur gradient de sucrose et de pull-down en présence de vésicules artificielles, nous avons mis en évidence une compétition entre le domaine Sec7 et les lipides pour la liaison au domaine N-BAR. Dans nos conditions expérimentales nous observons que l'interaction entre EFA6 et l'endophiline est contrôlée par la courbure membranaire. En effet, les expériences de pull down montrent que la présence de vésicules à fort degré de courbure dissocie le complexe EFA6/endophiline. Alors que le domaine N-BAR seul se retrouve dans la fraction Top liée aux vésicules mimant une membrane plane à la suite de l'expérience de flottaison, on le retrouve dans la fraction Bottom en présence du domaine Sec7. Ceci est en faveur d'un effet dissociateur du domaine Sec7 sur l'interaction entre le domaine N-BAR et les membranes planes. Ces résultats mettent en évidence pour la première fois le contrôle d'une interaction protéine-protéine par une courbure membranaire.

Nous avons pu observer par des expériences de diffusion dynamique de lumière et de microscopie électronique que l'endophiline A1 déforme et tubularise des vésicules de grande taille et que cet effet est inhibé en présence du domaine Sec7 d'EFA6.

Nous avons observé par des expériences d'immunofluorescence que l'endophiline A2 se localise principalement au niveau du cytosol alors qu'EFA6 se trouve à la membrane plasmique au niveau de replis membranaires. Lorsque ces deux protéines sont cotransfectées, on observe que l'endophiline A2 se relocalise en partie à la membrane plasmique dans des structures riches en EFA6.

Nous nous sommes intéressés à l'internalisation du récepteur à la transferrine. En effet, des études précédentes menées au laboratoire avaient mis en évidence que la surexpression d'EFA6 inhibait l'internalisation de la transferrine et induisait la redistribution de son récepteur à la surface par un mécanisme inconnu. Dans cette étude, nous avons confirmé cet effet d'EFA6 et avons observé que la surexpression de l'endophiline A2 n'avait aucun effet sur l'internalisation de la transferrine. En revanche, nous observons dans les cellules surexprimant l'endophiline et EFA6, que l'internalisation de la transferrine se fait de manière similaire aux cellules contrôles et aux cellules surexprimant l'endophiline A2 seule. Ceci montre que la surexpression d'endophiline est capable de lever l'effet inhibiteur de la surexpression d'EFA6 sur l'internalisation de la transferrine. De plus, ces résultats indiquent que l'endophiline et EFA6 agissent sur la même voie pour contrôler l'internalisation de la transferrine. Pour expliquer ces résultats nous avons retenus l'hypothèse qu'EFA6 surexprimé piégerait l'endophiline endogène l'empêchant ainsi d'assurer ses fonctions dans l'endocytose et qu'une surexpression complémentaire de l'endophiline est nécessaire pour réverser cet effet.

## IV. Résultats complémentaires

Dans le but d'approfondir les résultats obtenus sur l'effet stimulateur de l'endophiline A1 sur l'activité d'EFA6, nous avons réalisé des expériences complémentaires. Nous avons donc étudié l'effet de concentrations croissantes d'endophiline A1 sur la cinétique d'échange nucléotidique d'Arf6 catalysée par EFA6. Nous observons que plus la concentration d'endophiline A1 dans le milieu est importante, plus la liaison d'Arf6 au GTPγS est élevée. L'endophiline augmente l'activité d'échange d'EFA6 sur Arf6 de manière dépendante de la dose (Figure 34).

Au cours de cette étude nous avons également cherché à déterminer si l'interaction du domaine Sec7 d'EFA6 avec le domaine N-BAR est spécifique de l'endophiline. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de pull-down avec le domaine Sec7 d'EFA6 et différentes protéines possédant des domaines N-BAR dont l'amphyphysine, l'Arfaptine et l'endophiline

en contrôle. Nous avons pu observer que ni l'amphiphysine, ni l'Arfaptine n'interagissaient directement avec le domaine Sec7 d'EFA6. Ces résultats suggèrent que la structure 3D n'est pas suffisante et que la séquence primaire du domaine BAR est importante pour la liaison à EFA6 (Figure article S2).

Nous nous sommes également intéressés au rôle de cette interaction sur l'internalisation d'autres récepteurs et notamment le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. Nous savons que la fixation du ligand induit l'internalisation du RCPG activé. Afin de déterminer si l'endophiline et EFA6 ont un rôle sur cette internalisation, nous avons effectué des expériences d'immunofluorescence sur des cellules HEK exprimant stablement le récepteur β2adrénergique couplé à la GFP et transfectées avec l'endophiline A2 seule ou avec EFA6. Suite à l'addition d'isoprotérenol, nous observons une internalisation du récepteur. Le récepteur s'accumule dans des vésicules à l'intérieur des cellules. Cette internalisation est dépendante du temps d'incubation avec le ligand. Nous pouvons observer que plus la durée d'incubation avec le ligand est longue, plus le récepteur se retrouve à l'intérieur des cellules. Nous n'observons aucune différence significative sur l'internalisation du récepteur β2adrénergique quand l'endophiline A2 est transfectée seule ou avec EFA6 (Figure 35). Cette expérience ne nous permet donc pas de conclure quant au rôle de ces deux protéines et de leur interaction sur l'internalisation de ce récepteur, mais suggère que la quantité de ces deux protéines n'est pas limitante car leur surexpression n'accélère pas le processus d'internalisation. Dans le but de répondre à cette question, il serait intéressant d'éteindre l'expression de ces deux protéines dans les cellules à l'aide de siRNA. Cependant l'existence de plusieurs isoformes de ces deux protéines complique l'interprétation de ces expériences.

Des expériences menées au laboratoire ont montré que dans des cellules HEK transfectées stablement avec le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique couplé à la GFP et cultivées dans un milieu avec sérum, EFA6 était capable de redistribuer le récepteur à l'intérieur des cellules. Des expériences plus approfondies menées au laboratoire suggèrent que cet effet ne serait pas dû à une stimulation de l'internalisation mais à une inhibition du recyclage et serait dépendant de l'activation d'Arf6. Afin de visualiser la redistribution du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique induite par EFA6 et de déterminer si l'expression de l'endophiline affectait cet effet, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorecence sur les cellules HEK exprimant stablement le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique et transfectées avec EFA6 et/ou l'endophiline A2. Nous observons dans les cellules surexprimant EFA6 et cultivées dans un

93

milieu sans sérum, que le récepteur β2-adrénergique se localise majoritairement à la membrane plasmique (Figure 36, panneau gauche). Cependant, lorsque ces cellules surexprimant EFA6 sont cultivées en présence de sérum, nous constatons une forte redistribution du récepteur à l'intérieur des cellules (Figure 36, panneau droite). En revanche, l'endophiline A2 ne semble pas avoir d'effet sur la localisation du récepteur que l'on soit en présence ou en absence de sérum. Cet effet du sérum dépend de la présence d'EFA6 car en absence d'EFA6 le récepteur se retrouve principalement à la membrane plasmique.

Nous observons aussi que l'expression de l'endophiline A2 n'inhibe pas la redistribution du récepteur induite par l'expression d'EFA6 en présence de sérum.

Ces résultats nous montrent qu'EFA6 est capable de redistribuer le récepteur en présence de sérum et que cette redistribution n'est pas affectée par la sur-expression d'endophiline. L'endophiline ne semble donc pas jouer un rôle dans le mécanisme de recyclage du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique stimulé ou non.

Nous nous sommes aussi intéressés à la dynamique des puits d'endocytose par la technique de TIR-FM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) autrement appelée microscopie à ondes évanescentes. Cette technique permet d'observer les protéines fluorescentes au voisinage de la membrane plasmique (à moins de 200nm). Elle est particulièrement adaptée pour visualiser les protéines présentes au niveau des puits et de déterminer leurs temps de résidence. Nous constatons ainsi que dans les cellules l'endophiline A2 a un marquage ponctiforme, suggérant une localisation au niveau des puits d'endocytose. Nous observons également que les points marqués par l'endophiline A2 sont dynamiques et ont une durée de vie d'une dizaine de secondes. En revanche nous remarquons qu'EFA6 possède un marquage diffus traduisant une localisation à la membrane plasmique comme décrit précédemment (Figure 37). Ces résultats mettent en évidence que l'endophiline A2 semblent être présente au niveau des puits d'endocytose alors qu'EFA6 n'y est pas concentrée.



Figure 34: L'endophiline stimule l'activité catalytique d'EFA6 de manière dose dépendante.

La liaison du GTP $\gamma$ S[<sup>35</sup>S] sur de l'Arf6 myristylé et purifié (2 $\mu$ M) a été mesurée en présence de vésicules artificielles, d'His-EFA6 (200nM) et de différentes concentrations de GST-endophiline A1 (0, 0.2, 0.5 et 2 $\mu$ M). La quantité d'Arf6 liée au GTP $\gamma$ S est déterminée au bout de 30min par filtration sur membrane de nitrocellulose et est exprimée en cpm (coups par minute)



# Figure 35: Le complexe EFA6/endophiline ne semble pas perturber l'internalisation du

#### récepteur β2-adrénergique.

Les cellules HEK exprimant stablement le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique couplé à la GFP sont transfectées avec la myc-endophiline A2 +/-RFP-EFA6. 24h après transfection, les cellules sont maintenues dans un milieu sans sérum pendant 5h puis les récepteurs sont activés par 100nM d'isoprotérénol pendant 2, 5 ou 10 min. L'endophiline est révélée par un anticorps anti-myc (9E10).



## <u>Figure 36: L'effet d'EFA6 sur la redistribution du récepteur β2-adrénergique n'est pas</u> perturbé par son interaction avec l'endophiline.

Les cellules HEK exprimant stablement le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique couplé à la GFP sont transfectées avec la myc-endophiline A2 ou RFP-EFA6 seule ou ensemble. 24h après transfection les cellules sont maintenues dans un milieu sans ou avec sérum (respectivement –SVF et +SVF). L'endophiline est révélée par un anticorps anti-myc (9E10).

Les flèches montrent une colocalisation.


# Figure 37 : L'endophiline se localise au niveau des puits d'endocytose lors de l'internalisation du récepteur β2-adrénergique

Les cellules Hela sont transfectées avec la GFP-endophiline A2, RFP-EFA6 et le récepteur  $\beta$ 2adrénergique HA. 48h après transfection les cellules incubées dans du PBS glucose (4g/I), sont observées en TIR-FM après stimulation des récepteurs par 1µM d'isoprotérenol.

# V. Conclusion

Dans cette étude nous avons pu identifier et caractériser l'interaction directe entre le facteur d'échange EFA6 et l'endophiline. Cette interaction, qui à notre connaissance est la première décrite entre un facteur d'échange pour les Arf et une protéine à domaine Bar, renforce le lien entre la voie de signalisation EFA6/Arf6 dépendante et le trafic vésiculaire intracellulaire. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de proposer un modèle rendant compte du rôle d'EFA6 et de l'endophiline. En effet, EFA6 serait un des facteurs permettant le recrutement de l'endophiline à la membrane plasmique. Lorsque la membrane est plane, le complexe formé entre EFA6 et l'endophiline serait stable et permettrait l'activation d'Arf6. En revanche, au voisinage d'une vésicule en formation, le domaine N-BAR sensible à la courbure se dissocierait du domaine Sec7 d'EFA6 afin de se lier à la vésicule et assurer sa fonction.

En conclusion, cette étude met en évidence que l'endophiline et EFA6 agissent comme des régulateurs de l'internalisation de certains récepteurs et coopèrent pour réguler l'endocytose clathrine dépendante.

# Résultats partie 2 : Mécanismes de régulation d'EFA6

# Résultats partie 2 : Mécanismes de régulation d'EFA6

# I. Introduction

Dans la seconde partie de ma thèse je me suis intéressée aux mécanismes de régulation du facteur d'échange EFA6. EFA6 est le premier facteur d'échange spécifique de la petite protéine G Arf6 à avoir été identifié. Il existe 4 isoformes d'EFA6 qui partagent la même structure. Celle-ci consiste en un domaine N-terminal très peu conservé et dont le rôle est encore indéterminé, un domaine Sec7 qui est responsable de l'activité catalytique de cette protéine, un domaine PH capable d'interagir avec les phospholipides permettant ainsi sa localisation à la membrane plasmique et un domaine C-terminal composé d'un domaine coiled-coil et de deux domaines riches en proline et responsable de la réorganisation du cytosquelette d'actine (Franco et al., 1999). Cet effet du C-terminal est probablement du en parti à son interaction directe avec l'actine filamenteuse (Macia et al., 2008) et l' $\alpha$ -actinine (Sakagami et al., 2007). EFA6 a été décrit comme étant un acteur dans différents processus cellulaires. Elle intervient dans la mise en place de la polarité épithéliale en favorisant et stabilisant l'assemblage des jonctions serrées (Klein et al., 2008; Luton et al., 2004). Comme nous avons pu le voir précédemment EFA6 est également impliqué dans le trafic intracellulaire de différentes protéines membranaires telles que le récepteur à la transferrine (Franco et al., 1999), le récepteur  $\beta$ 2- adrénergique (Macia et al., 2012) ou le canal potassique TWIK1 (Decressac et al., 2004). Nous avons mis en évidence qu'EFA6 interagit directement avec l'endophiline (Boulakirba et al., 2014), une protéine importante dans l'endocytose, et que cette interaction participe à l'endocytose dépendante de la clathrine. Malgré les différentes études sur les fonctions d'EFA6, son mécanisme de régulation reste encore inconnu. En effet, pour assurer spécifiquement ses fonctions EFA6 ne peut pas être constutivement actif mais doit l'être dans des conditions spatio-temporelles précises. Ainsi déterminer les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'activation des facteurs d'échanges est essentiel pour comprendre l'ensemble des voies qu'ils régulent. Différentes études ont donc porté sur la détermination des mécanismes de régulation des facteurs d'échange et notamment du facteur d'échange ARNO (Hiester and Santy, 2013; Stalder et al., 2011). ARNO appartient lui aussi à la famille des facteurs d'échange à domaine Sec7 et est impliqué dans la régulation des petites protéines G Arf lors des processus de migration et de changement de la morphologie cellulaire. Une étude menée par l'équipe du Dr Santy a mis en évidence un repli intramoléculaire au sein de la protéine ARNO (Hiester and Santy, 2013). Ce repli régule l'activité d'échange d'ARNO en contrôlant son association aux membranes phospholipidiques qui sont des cofacteurs pour l'activation des Arfs. En effet, ARNO a été décrit comme pouvant être sous une forme auto-inhibée, où le domaine Cterminal polybasique, en association avec la région linker entre le domaine Sec7 et le domaine PH sur laquelle il se replie, joue le rôle de pseudo-substrat et inhibe l'activité catalytique du domaine Sec7. Il a été mis en évidence que le domaine coiled-coil en Nterminal se replie sur le reste de la protéine jouant un rôle dans l'auto-inhibition d'ARNO. Ce facteur d'échange a besoin de deux signaux distincts pour se retrouver dans une conformation pleinement active. Le premier signal permet la levée de l'inhibition par le pseudo-substrat et peut se faire par différents mécanismes seuls ou combinés. Il peut se faire par phosphorylation de la Sérine 392 du domaine polybasique par la protéine PKC (Protein Kinase C). L'interaction de la petite protéine G Arf6 sous sa conformation activée avec le domaine PH d'ARNO permet le recrutement de ce dernier à la membrane plasmique et a été montré comme favorisant la dissociation du pseudo-substrat. Ce premier signal permet d'obtenir une forme intermédiaire. Le second signal permet d'interrompre l'interaction entre le domaine coiled-coil et le reste de la protéine et ainsi, obtenir une forme capable d'interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique ce qui la rend totalement active. Cette étape nécessite la phosphorylation par la protéine Akt de la Thréonine 276 du domaine PH (Figure 38). Par analogie avec le facteur d'échange ARNO et dans le but de mieux comprendre le rôle d'EFA6 ainsi que la voie Arf6, nous nous sommes intéressés à ses mécanismes de régulation.



# Figure 38: Schéma des mécanismes de régulation du facteur d'échange ARNO (Hiester and Santy, 2013).

Le passage d'un état inactif à un état activé du facteur d'échange ARNO est dépendant de son état de phosphorylation et de son interaction avec la protéine Arf6-GTP et les phospholipides.

# II. EFA6 régule l'activation d'Arf1 et d'Arf6 par une boucle de rétrocontrôle négatif

# A. Introduction

Les membres de la famille des facteurs d'échange à domaine Sec7, EFA6, BRAG et Cytohésine possèdent des domaines N-terminaux divergents mais partagent une organisation commune. En effet ils sont composés d'un domaine Sec7 qui stimule l'échange GDP/GTP, suivi d'un domaine PH capable de lier les phospholipides membranaires et de réguler différentes fonctions. Dans cet article en collaboration avec l'équipe du Dr Jacqueline Cherfils, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de régulation du facteur d'échange EFA6 par son domaine PH-C-terminal. Pour cela des expériences reconstituant l'activité d'échange GDP/GTP d'EFA6 sur les protéines Arfs ont été réalisées sur des membranes. L'activité d'échange du domaine Sec7 d'EFA6 seul ou combiné à son domaine PH-C-terminal sur les protéines Arf6 myristilées ou non ou ne possédant pas l'hélice  $\alpha$  en N-terminal ( $\Delta$ 13Arf6) a été mesurée par la technique de fluorescence du tryptophane. En effet, le tryptophane est un des acides aminés aromatiques composant les protéines et contribuant à la fluorescence intrinsèque de ces dernières. La fluorescence du tryptophane est utilisée pour suivre le changement de conformation des protéines Arf. Sur Arf6 comme sur Arf1 deux tryptophanes ont été identifiés comme étant sensibles aux changements de conformation lors du cycle GDP/GTP et responsables d'une forte augmentation de la fluorescence intrinsèque que l'on observe.

# B. Résultats

Dans un premier temps les expériences ont été réalisées en solution en présence du  $\Delta$ 13Arf6, qui est une forme soluble d'Arf6 car dépourvue de l'hélice N-terminal, et du domaine Sec7 ou des domaines Sec7-PH-C-terminal. Nous avons pu observer une faible activation du  $\Delta$ 13Arf6 par le domaine Sec7. En revanche nous constatons que la cinétique d'échange est augmentée par un facteur 7 par la construction Sec7-PH-C-terminal. Ces

expériences ont également été réalisées en présence de liposomes contenant de PIP2 sur de l'Arf6 myristylée (myr-Arf6). Dans ces conditions, on remarque également que la présence de liposomes stimule la cinétique d'activation de la protéine myrArf6 catalysée par le Sec7 et que cette stimulation est plus importante en présence du Sec7-PH-C-terminal.

Ces résultats mettent en évidence que, contrairement à ARNO, le domaine PH-C-terminal d'EFA6 n'est pas auto-inhibiteur sur son activité d'échange et que cette dernière est stimulée en présence de liposomes. La composition des liposomes joue un rôle important dans cet effet activateur. En effet des expériences complémentaires ont permis de démontrer que comparativement aux expériences réalisées en solution l'ajout de liposomes non chargés n'avait pas d'effet sur la cinétique d'activation d'Arf6. En revanche nous avons pu observer que l'ajout de vésicules composées de PIP2, de PhosphatydylSérine (PS) ou des deux potentialise fortement l'échange nucléotidique catalysé par EFA6.

L'ensemble de ces résultats suggère que les protéines myrArf6 et Sec7-PH-C-terminal, capables d'interagir avec les phospholipides membranaires et notamment le PIP2, vont se retrouver colocalisées, avec une orientation optimale, au niveau des membranes. Cette réduction de dimensionnalité entre EFA6 et son substrat potentialiserait ainsi l'activation d'Arf6.

De façon intéressante, cette étude a également montré qu'Arf6-GTP, le produit de la réaction catalysée par EFA6, joue un rôle dans le rétrocontrôle négatif de son facteur d'échange. En effet, on constate qu'en présence d'Arf6-GTP incubée préalablement avec les liposomes, l'effet catalytique d'EFA6 sur l'échange nucléotidique est inhibé. De plus cette inhibition est dose dépendante et est spécifique de l'isoforme Arf6.

La suite du projet a porté sur la détermination du mécanisme par lequel Arf6-GTP induit son effet inhibiteur. Des expériences réalisées en solution ont montré que le Δ13Arf6-GTP n'a pas d'effet sur l'activation de Δ13Arf6-GDP par le Sec7 montrant qu'Arf6-GTP n'agit pas par une compétition pour la liaison du domaine Sec7. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'effet d'Arf6-GTP était dû à une interaction avec le domaine PH-C-terminal. Pour tester cette hypothèse des liposomes ont été incubés préalablement avec de l'Arf6-GTP puis des doses croissantes de PH-C-terminal purifié ont été ajoutées à ce mélange avant le début de la réaction catalysée par EFA6 Sec7-PH-C-terminal. Nous avons pu observer une diminution de

l'inhibition induite par Arf6-GTP en présence du domaine PH-C-terminal. Nous remarquons également que plus la concentration de PH-C-terminal est important plus l'inhibition induite par Arf6 est diminuée. Cette expérience met en évidence que le domaine PH-C-terminal est capable, de manière dose dépendante, de bloquer le rétrocontrôle négatif induit par Arf6-GTP. Ces résultats suggèrent aussi que le domaine PH-C-terminal lève cet effet inhibiteur en séquestrant l'Arf6-GTP.

Mon rôle dans ce projet a été de confirmer cette interaction entre le domaine PH-C-terminal d'EFA6 et Arf6-GTP. Pour cela j'ai réalisé une expérience de pull-down sur des lysats cellulaires surexprimant soit ArfQ67L soit Arf6T157N, deux formes liant principalement le GTP. Ainsi on a pu mettre en évidence que le domaine PH-C-terminal est capable d'interagir avec ces deux constructions d'Arf6 liées au GTP. Cette interaction a été confirmée par une expérience de co-sédimentation que j'ai réalisée à l'aide de domaine PH-C-terminal d'EFA6 et d'Arf6-GTP non myristylée. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le domaine PH-C-terminal d'EFA6, qui est principalement lié aux membranes, est capable de recruter Arf6-GTP non myristylé, qui est principalement soluble, au niveau de liposomes. Cette expérience a ensuite été reproduite et confirmée par l'équipe du Dr Cherfils avec la protéine Δ13Arf6-GTP.

L'ensemble de ces résultats a permis de proposer un modèle selon lequel EFA6 serait régulé par un rétrocontrôle négatif induit par l'interaction de son produit Arf6-GTP avec son domaine PH-C-terminal.



# EFA6 controls Arf1 and Arf6 activation through a negative feedback loop

Dominique Padovani<sup>a,1,2</sup>, Marcia Folly-Klan<sup>a</sup>, Audrey Labarde<sup>a</sup>, Sonia Boulakirba<sup>b</sup>, Valérie Campanacci<sup>a</sup>, Michel Franco<sup>b</sup>, Mahel Zeghouf<sup>a</sup>, and Jacqueline Cherfils<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Centre National de la Recherche Scientifique, Centre de Recherche de Gif, 91198 Gif-sur-Yvette, France and <sup>b</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique and University of Nice-Sophia Antipolis, 06560 Sophia-Antipolis, France

Edited by John Kuriyan, University of California, Berkeley, CA, and approved July 10, 2014 (received for review May 27, 2014)

Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) of the exchange factor for Arf6 (EFA6), brefeldin A-resistant Arf guanine nucleotide exchange factor (BRAG), and cytohesin subfamilies activate small GTPases of the Arf family in endocytic events. These ArfGEFs carry a pleckstrin homology (PH) domain in tandem with their catalytic Sec7 domain, which is autoinhibitory and supports a positive feedback loop in cytohesins but not in BRAGs, and has an as-yet unknown role in EFA6 regulation. In this study, we analyzed how EFA6A is regulated by its PH and C terminus (Ct) domains by reconstituting its GDP/GTP exchange activity on membranes. We found that EFA6 has a previously unappreciated high efficiency toward Arf1 on membranes and that, similar to BRAGs, its PH domain is not autoinhibitory and strongly potentiates nucleotide exchange on anionic liposomes. However, in striking contrast to both cytohesins and BRAGs, EFA6 is regulated by a negative feedback loop, which is mediated by an allosteric interaction of Arf6-GTP with the PH-Ct domain of EFA6 and monitors the activation of Arf1 and Arf6 differentially. These observations reveal that EFA6, BRAG, and cytohesins have unanticipated commonalities associated with divergent regulatory regimes. An important implication is that EFA6 and cytohesins may combine in a mixed negative-positive feedback loop. By allowing EFA6 to sustain a pool of dormant Arf6-GTP, such a circuit would fulfill the absolute requirement of cytohesins for activation by Arf-GTP before amplification of their GEF activity by their positive feedback loop.

endocytosis | membrane traffic | kinetics | autoinhibition

Guanine nucleotide exchange factors (GEFs), which activate Small GTPases by stimulating their intrinsically very slow GDP/GTP exchange, are key players in the extraordinary diversity of small GTPases pathways (reviewed in ref. 1). Small GTPases carry little specificity determinants on their own to determine when and where they should be turned on and which pathway they should activate (2), which are instead largely monitored by their GEFs. Thus, understanding how different members of a GEF family activate an individual small GTPase in distinct patterns is a major issue in small GTPase biology in normal cells and in diseases.

An important contribution to the functional specificity of GEFs is how they themselves are regulated. Crystallographic studies combined with biochemical studies that reconstituted GEF-stimulated GDP/GTP nucleotide exchange have been instrumental in uncovering a growing complexity of regulatory mechanisms (reviewed in ref. 1). These include autoinhibitory elements outside the catalytic GEF domain that block access to the active site (3–7), large conformational changes that release autoinhibition in response to various stimuli (8–11), positive feedback loops in which freshly produced GTP-bound GTPases stimulate GDP/GTP exchange (10, 12–15), and potentiation of nucleotide exchange by colocalization on membranes (11, 13, 16, 17).

These previous studies demonstrated that a wide range of regulatory regimes can be achieved even at the scale of a single GEF family by regulatory mechanisms that combine in multiple ways.

12378-12383 | PNAS | August 26, 2014 | vol. 111 | no. 34

GEFs that activate small GTPases of the Arf family (ArfGEFs), which are major regulators of many aspects of membrane traffic and organelle structure in eukaryotic cells (reviewed in refs. 18 and 19), form one of the best-characterized GEF families to date (reviewed in ref. 1), making a comprehensive view of their regulatory repertoire within reach. ArfGEFs comprise two major groups: the BIG/GBF1 group, which functions at the Golgi, and a group composed of the exchange factor for Arf6 (EFA6), brefeldin A-resistant Arf guanine nucleotide exchange factor (BRAG), and cytohesin subfamilies, which activate Arf GTPases at the cell periphery and function in various aspects of endocytosis (reviewed in ref. 20). The actual substrates of these Arf-GEFs have been difficult to establish, notably because the most abundant Arf isoform, Arf1, was long believed to be excluded from the plasma membrane where the Arf6 isoform is located. Accordingly, cytohesins and BRAGs have been described as Arf6-Specific GEFs in cells but are now recognized as active Arf1-GEFs (16, 21, 22), whereas EFA6 remains the sole ArfGEF considered to be strictly Arf6-specific (23, 24). Members of the EFA6, BRAG, and cytohesin subfamilies have

Members of the EFA6, BRAG, and cytohesin subfamilies have divergent N-terminal domains but a related domain organization in their C terminus comprising a Sec7 domain, which stimulates GDP/GTP exchange, followed by a pleckstrin homology (PH) domain, which has multiple regulatory functions. In cytohesins, the PH domain recognizes signaling phosphoinositides by its canonical lipid-binding site (25), autoinhibits the Sec7 domain by obstructing its Arf-binding site (4), and amplifies nucleotide

#### Significance

EFA6, cytohesins, and BRAGs activate Arf GTPases in endocytic events. They carry a plasma membrane-binding PH domain in tandem with their catalytic Sec7 domain, which is autoinhibitory and mediates a positive feedback loop in cytohesins but not in BRAGs, and has an as-yet unknown role in EFA6 regulation. By reconstituting GDP/GTP exchange on membranes, we find that the PH domain of EFA6 is not autoinhibitory, but supports a negative feedback loop. This loop is controlled by interaction of Arf6-GTP with the PH-Ct domains of EFA6 and monitors Arf1 and Arf6 activation differentially. This suggests that EFA6 and cytohesins might be coupled in a mixed negative-positive feedback loop to shape the level and timing of Arf1 and Arf6 activation in endocytosis.

Author contributions: D.P., M.F., and J.C. designed research; D.P., M.F.-K., A.L., S.B., V.C., M.F., and M.Z. performed research; D.P., M.F.-K., S.B., V.C., M.F., M.Z., and J.C. analyzed data; and D.P. and J.C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup> Present address: Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, UMR8601 CNRS-Université Paris Descartes, PRES Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France.
<sup>2</sup> To whom correspondence may be addressed. E-mail: dominique.padovani@ parisdescartes,f or cherfils@lebs.cnrs-aif.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10. 1073/pnas.1409832111/-/DCSupplemental.

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1409832111

**IOCHEMISTR** 



Fig. 1. Regulation of Arf1 and Arf6 activation by EFA6 on membranes. (A) EFA6 constructs used in this study (12% SDS/PAGE, 3 µg/lane). (B) EFA6 is not autoinhibited by its PH-Ct domain. Representative tryptophan fluorescence kinetic traces for Δ13Arf6 (1 µM) activation in solution by EFA6 constructs (100 nM) as indicated. (C) EFA6 is strongly potentiated by membranes. Representative kinetic traces for <sup>myr</sup>Arf6 (0.4 µM) activation by EFA6<sup>Sec7-PH-Ct</sup> (10 nM) or EFA6<sup>Sec7</sup> (220 nM) in the presence of liposomes. (D) EFA6 is a potent Arf1GEF on membranes. Representative tryptophan fluorescence kinetic traces for <sup>myr</sup>Arf1 activation by EFA6<sup>Sec7-PH-Ct</sup> (3.75 nM) or EFA6<sup>Sec7</sup> (575 nM).

exchange by a positive feedback loop involving its direct interaction with Arf1-GTP or Arf6-GTP (10, 13, 21). In contrast, the PH domain of BRAG is not autoinhibitory and is not involved in a feedback loop, but instead strongly potentiates nucleotide exchange by binding to polyanionic membranes without marked phosphoinositides preference (16).

How members of the EFA6 subfamily are regulated is currently unknown. These ArfGEFs are found predominantly (although not exclusively) in the brain and function in the coordination of endocytosis and actin dynamics (23, 26, 27), in the maintenance of tight junctions (28), in microtubule dynamics in *Caenorhabditis elegans* embryos (29), and in the formation and maintenance of dendrites (30), although the molecular details of these functions remain largely unknown. Consistent with an important role in the brain, defects in EFA6 functions have been found in neurologic disorders (31) and in human gliomas (32). The PH domain of EFA6 subfamily members drives the localization of EFA6 members to the plasma membrane (26) and it binds to PIP2 lipids (33). It is followed by a 150-residue C-terminal (Ct) domain predicted to form a coiled coil, which massively induces actin-rich membrane protrusions when expressed with the PH domain (26). The divergence of regulatory mechanisms between Sec7-PHcontaining cytohesins and BRAGs prompted us to undertake a quantitative biochemical investigation of EFA6 nucleotide exchange regulation. Our findings reveal an overlooked dual specificity of EFA6 for Arf1 and Arf6 and an unprecedented regulation by a negative feedback loop, with important potential implications for the activation of Arf GTPases in endocytic events.

#### Results

**EFA6 Is Not Autoinhibited by Its PH Domain and Is Potentiated by Membranes.** To quantify the GEF efficiency of human EFA6, we performed nucleotide exchange kinetics analyses with EFA6A constructs encompassing the Sec7 domain (EFA6<sup>Sec7</sup>) or the entire C-terminal region (EFA6<sup>Sec7-PH-C1</sup>) along with the cellular form of Arf6 that carries a myristate attached to its N-terminal glycine (<sup>myr</sup>Arf6), full-length Arf6 lacking the myristate group (<sup>unmyr</sup>Arf6), or a soluble construct lacking the N-terminal α-helix (Δ13Arf6). All recombinant proteins were highly pure (Fig. 1*A* and Fig. S1; for Arf proteins, see refs. 16 and 34), allowing accurate kinetics analysis using tryptophan fluorescence (Table 1).

We first analyzed the nucleotide exchange efficiency ( $k_{cat}/K_M$ ) of the different EFA6 constructs in solution (Fig. 1B). EFA6<sup>Sec7</sup> activated  $\Delta$ 13Arf6 with  $k_{cat}/K_M = 1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , which is in the same range as values reported for cytohesins (35) and BRAGs (16). EFA6<sup>Sec7.PH-C1</sup> was more active than EFA6<sup>Sec7</sup>

Padovani et al.

by approximately sevenfold, indicating that the PH-Ct domain is not autoinhibitory but instead contributes a slight potentiation. EFA6<sup>Sec7</sup> and EFA6<sup>Sec7-PH-Ct</sup> were essentially inactive toward <sup>unmyr</sup>Arf6 (in the 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> range), demonstrating that neither the Sec7 domain nor the PH-Ct domain carry determinants to displace the N-terminal helix of Arf6, which locks its GDP-bound form (36).

We next analyzed the efficiency of our EFA6 constructs in the presence of PIP<sub>2</sub>-containing anionic liposomes (Fig. 1C). EFA6<sup>Sec7</sup> was insensitive to liposomes, whereas liposomes increased the catalytic efficiency of EFA6<sup>Sec7-PI+C1</sup> toward <sup>unmyr</sup>Arf6, which tethers weakly to membranes by its amphipathic N-terminal helix, but not toward  $\Delta$ 13Arf6, which lacks all membranetethering elements. The maximal  $k_{cat}/K_M$  value (2 × 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) was reached for <sup>myr</sup>Arf6, in which all membrane-tethering elements are present, which is approximately three orders of magnitude more efficient than EFA6<sup>Sec7</sup>/ $\Delta$ 13Arf6 in solution. These observations indicate that a major component of EFA6 full efficiency stems from its recruitment to membranes by its PH-Ct domain.

We next analyzed whether the efficiency of EFA6 would be sensitive to liposome characteristics, as has been shown recently for other human and bacterial ArfGEFs (11, 13, 16) (Table S1 and Fig. S24). The addition of uncharged liposomes had essentially no effect compared with experiments carried out in solution, whereas all liposomes containing PIP<sub>2</sub>, PS, or both strongly potentiated nucleotide exchange. Surprisingly, the effects of PIP<sub>2</sub> and PS were not additive, raising the possibility that EFA6 could bind to membranes by unspecific electrostatic interactions, as was recently reported for BRAG (16). EFA6<sup>Sec7-PH-Ct</sup> and EFA6<sup>PH-Ct</sup>

Table 1. Catalytic efficiencies ( $k_{cat}/K_M$ ,  $M^{-1}s^{-1}$ ) of EFA6<sup>5ec7</sup> or EFA6<sup>5ec7-PH-Ct</sup> toward Arf1 and Arf6 constructs in the absence (–) or presence (+) of 100  $\mu$ M liposomes

Substrate		EFA6 <sup>Sec7</sup>	EFA6 <sup>Sec7-PH-Ct</sup>
∆13Arf6	_	$1.70 \pm 0.02 \ 10^4$	1.11 ± 0.02 10 <sup>5</sup>
	+	ND	$2.90 \pm 0.07 \ 10^{10}$
<sup>unmyr</sup> Arf6	-	$6.87 \pm 0.24 \ 10^2$	$1.13 \pm 0.07 \ 10^{3}$
	+	$7.80 \pm 0.38 \ 10^2$	$1.42 \pm 0.05 \ 10^6$
<sup>myr</sup> Arf6	+	$5.07 \pm 0.17 \ 10^3$	$2.06 \pm 0.08 \ 10^{-1}$
∆17Arf1	-	$3.18 \pm 0.12 \ 10^2$	$1.13 \pm 0.05 \ 10^{-1}$
<sup>unmyr</sup> Arf1	+	ND	$1.67 \pm 0.35 \ 10^{-2}$
<sup>myr</sup> Arf1	+	$5.36 \pm 0.55 \ 10^2$	5.61 ± 0.13 10 <sup>6</sup>

ND, not determined.

All values are the average  $\pm$  SD of three independent experiments.

PNAS | August 26, 2014 | vol. 111 | no. 34 | 12379

bound IP<sub>3</sub>, the inositol-phosphate headgroup of PIP<sub>2</sub>, with  $K_D$  values in the same range as those reported for GST-EFA6<sup>PH</sup>- and PIP<sub>2</sub>-containing vesicles (33) (Fig. S2 *B* and *C*), suggesting that EFA6 interacts with PIP<sub>2</sub> in a specific manner. The addition of IP<sub>3</sub> did not have a significant effect on the nucleotide exchange efficiency of EFA6<sup>Sec7-PH-Ct</sup> in solution (Fig. S2*D*), suggesting that binding of PIP<sub>2</sub> to the PH domain does not exert an allosteric effect on the Sec7 domain. Finally, EFA6 did not appear to be sensitive to the curvature of liposomes (Fig. S2*E*) or to the presence of cholesterol (Table S1).

Taken together, the foregoing experiments suggest that membranes potentiate EFA6<sup>sec7-PI-Ct</sup> efficiency through colocalization with <sup>myr</sup>Arf6 and the resulting optimization of their relative orientations, and that the PH-Ct domain has specific interactions with PIP<sub>2</sub> and possibly nonspecific electrostatic interactions with anionic lipids.

**EFA6A is an Efficient Arf1-GEF on Membranes.** Previous studies found that EFA6 is inactive toward Arf1 in vitro (23, 26, 37), consistent with the long-prevailing view that Arf1 is excluded from the plasma membrane. However, more recent studies established that Arf1 is activated at the plasma membrane (21, 38) and showed that both Arf1 and Arf6 are substrates for cytohesins (4, 13) and BRAGs (16, 22). This prompted us to analyze the exchange efficiency of EFA6<sup>Sec7</sup> and EFA6<sup>Sec7</sup>-PH-Ct</sup> toward <sup>myr</sup>Arf1, <sup>unmyr</sup>Arf1, and Δ17Arf1 in solution and on liposomes of varying composition (Table 1 and Table S1). EFA6 did not activate Arf1 in most cases ( $k_{cat}/K_{M}$  in the 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> range or less), confirming previous observations. However, when using (EFA6<sup>Sec7</sup>-PH-Ct</sup> and <sup>myr</sup>Arf1) in the presence of liposomes (Fig. 1D),  $k_{cat}/K_{M}$  increased by more than 10,000-fold compared with  $\Delta$ 17Arf1/EFA6<sup>Sec7</sup> in Solution, reaching a catalytic efficiency of 5.6 ± 0.1 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, which is only 3.6 lower than the catalytic efficiency toward <sup>myr</sup>Arf6 on liposomes.

The insensitivity of Arf1 to activation by EFA6 in solution could be related to its switch 1 region, which is important for its interaction with ArfGEFs and has the same sequence in Arf1 and Arf6, but is structurally less dynamic in Arf1 (39) than in Arf6 (40). The Sec7 domain of EFA6 features an arginine residue (R625) that replaces a highly conserved value that contacts the switch 1 of Arf1 in cytohesins (41), and thus would be well suited to sense this difference; however, the R625V mutation only slightly impaired  $\Delta$ 13Arf6 activation (Fig. S3*A*), and it did not restore activation of  $\Delta$ 17Arf1 by EFA6<sup>Sec7</sup> (Fig. S3*B*). Thus, EFA6 is an efficient GEF for <sup>myr</sup>Arf1 on liposomes, but why

nucleotide exchange is not recapitulated with  $\Delta$ 17Arf1 in solution cannot be explained by a simple sequence difference.

EFA6A Is Regulated by a Negative Feedback Loop Mediated by Arf6-GTP, but Not by Arf1-GTP. Positive feedback loops by freshly produced GTP-bound GTPases is emerging as a common trait of GEFs regulation (10, 12–15), although several examples have now been described that depart from this paradigm (7, 11, 16). To investigate the existence of a feedback mechanism in EFA6, we generated increasing amounts of <sup>myr</sup>Arf-GTP on liposomes before measuring nucleotide exchange, using all four possible combinations between Arf1 and Arf6. In striking contrast with the positive feedback effects observed in other GEFs, preloading liposones with <sup>myr</sup>Arf6-GTP resulted in a significant decrease of nucleotide exchange from both <sup>myr</sup>Arf1 (Fig. 2 *A* and *B*) and <sup>myr</sup>Arf6 (Fig. S44). <sup>myr</sup>Arf6-GTP inhibited <sup>myr</sup>Arf1 activation, with an IC<sub>50</sub> of 81  $\pm$  16 nM, and <sup>myr</sup>Arf6 activation, with an IC<sub>50</sub> of 944  $\pm$  203 nM (Fig. 2C). In contrast, <sup>myr</sup>Arf1-GTP had no effect on EFA6 exchange rate, regardless of whether the sub-strate was <sup>myr</sup>Arf1 (Fig. 2C and Fig. S4B) or <sup>myr</sup>Arf6 (Fig. S4C). These results identify a negative feedback loop never reported before for a GEF, and they suggest that this loop discriminates between the two Arf isoforms.

We next investigated the mechanism through which Arf6-GTP mediates its negative feedback effect. A simple possibility could be that Arf6-GTP competes with Arf-GDP as an inhibitor or a substrate of the Sec7 active site. The addition of increasing concentrations of  $\Delta 13$ Arf6-GTP had no effect on the activation of  $\Delta 13$ Arf6 by EFA6<sup>Sec7</sup> in solution, indicating that Arf6-GTP does not act through a simple competition effect (Fig. S54). Likewise, EFA6<sup>Sec-PH-Ct</sup> was unable to stimulate GTP-GDP exchange from <sup>myr</sup>Arf6-GTP on liposomes (Fig. S5B), indicating that Arf6-GTP is not a substrate of EFA6.

Alternatively, <sup>myr</sup>Arf6-GTP could act through an allosteric interaction with the PH-Ct domain. To test this hypothesis, we added increasing amounts of purified EFA6<sup>PH-Ct</sup> to liposomes preloaded with a fixed amount of <sup>myr</sup>Arf0-GTP before starting the exchange reaction with EFA6<sup>Sec-PH-Ct</sup> and <sup>myr</sup>Arf1. EFA6<sup>PH-Ct</sup> relieved the feedback effect in a dose-dependent manner (Fig. 3*A* and Fig. S5*C*), suggesting that EFA6<sup>PH-Ct</sup> reverses the negative feedback loop by titrating <sup>myr</sup>Arf6-GTP. Confirming that EFA6<sup>PH-Ct</sup> binds to Arf6-GTP, Arf6Q67L and Arf6T157N expressed in cells, both loaded predominantly with GTP (42), were efficiently pulled down by purified GST-EFA6<sup>PH-Ct</sup> (Fig. 3*B*). Finally, purified EFA6<sup>PH-Ct</sup> was able to recruit  $\Delta$ 13Arf6-GTP (which is soluble and does not bind to membranes) to



Fig. 2. EFA6A is regulated by a negative feedback loop mediated by Arf6-GTP. (A) A representative feedback loop experiment. Increasing amounts of  $m^{VI}Ch^{-6}$ -GTP (as indicated) were first generated on liposomes by EFA6 $^{Sec,PH-C1}$  (G nM). After the plateau was reached, a second exchange reaction was initiated by the addition of 0.4  $\mu$ M  $^{m_VI}Arf1$ -GDP, from which  $k_{obs}$  values were determined. (B) Alignment of the second part of the reaction shown in A. (C) Relative activities for the different Arf1/Arf6 combinations as a function of the initial  $^{m_VI}Arf$ -GTP amount generated on liposomes.

12380 | www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1409832111

Padovani et al.

BIOCHEMISTRY





liposomes (Fig. 3C), indicating that Arf6-GTP and EFA6<sup>PH-Ct</sup> interact directly and independently of the catalytic Sec7 domain. This ensemble of experiments suggests that the GEF activity

of EFA6 is regulated by a negative feedback loop actuated specifically by <sup>myr</sup>Arf6-GTP, and that the underlying mechanism involves an allosteric interaction of <sup>myr</sup>Arf6-GTP with the PH-Ct domain of EFA6.

#### Discussion

Higher eukaryotes have three subfamilies of ArfGEFs involved in endocytic events— cytohesins, BRAGs, and EFA6—all of which carry a PH domain associated with a catalytic Sec7 domain. Previous studies highlighted that this organization determines different regulatory mechanisms in cytohesins (4, 10, 13, 21) and in BRAGs (16), but how the GEF activity of EFA6 is regulated by its PH domain remained unknown. By analyzing the regulation of EFA6A activity toward Arf1 and Arf6 using nucleotide exchange reactions reconstituted on artificial membranes, this study reveals unexpected commonalities and divergences among the three ArfGEF subfamilies, yielding a framework for envisioning how they work on peripheral membranes. Our analysis shows that the Sec7 domain of EFA6 has a GEF

Our analysis shows that the Sec7 domain of EFA6 has a GEF efficiency toward Arf6 in the same range as that of cytohesins (35) and BRAGs (16). Likewise, the C-terminal region of EFA6, which includes the PH domain, supports strong potentiation of nucleotide exchange by membranes (by approximately three orders of magnitude), which is in the range reported for BRAG<sup>Sec7.PH</sup> (16). Our study also reveals that EFA6<sup>Sec7.PH-Ct</sup> is almost as potent an activator of Arf1 as Arf6 on membranes, possibly explaining why EFA6 leads to Arf1 activation in cell cultures (21). Taken

together, these observations reveal that EFA6 do not have major discrepancies with cytohesins and BRAGs in terms of intrinsic GEF efficiency or substrate preference.

In contrast, the regulatory modalities of EFA6 depart from those of cytohesins and BRAGs in various respects (Table 2). Notably, EFA6 is not autoinhibited by its PH domain and is regulated by a negative feedback loop mediated by interaction of its PH-Ct domains with Arf6-GTP. This interaction is reminiscent of the mechanism of feedback control of cytohesins by interaction of their PH domain with Arf-GTP (4, 10, 13, 21); however, the presence of a large C-terminal domain, which likely associates with the PH domain in EFA6 as suggested by smallangle X-ray scattering (SAXS) analysis (Fig. S1B), and the opposite regulatory effect of Arf-GTP suggest that the interaction probably is structurally very different. Furthermore, EFA6 discriminates between Arf1 and Arf6 as effectors of the negative feedback loop, an effect not seen in cytohesins, which are equally sensitive to activation by Arf1-GTP and Arf6-GTP (13). It should also be noted that EFA6 is potentiated equally well by PIP2-containing or anionic membranes but does not have a strict requirement for a specific phosphoinositide, and thus has membrane preferences distinct from those of both cytohesins (25) and BRAGS (16). Given the strong similarities between EFA6 subfamily members in their Sec7-PH-Ct regions (26), we predict that the regulatory modalities found for EFA6A in this study apply to all members of the subfamily. Whether their N-terminal regions, which are more divergent than their Sec7-PH-Ct regions (26) and have functions independent of Arf GTPases (29), add another layer of regulation remains to be investigated.

Table 2.	Regulatory	regime of	Sec7-PH-containing	endocytic ArfGEFs
----------	------------	-----------	--------------------	-------------------

ArfGEF	Arf	Membrane preference	Autoinhibition	Feedback loop	References
Cytohesins	Arf1/Arf6	PIP <sub>2</sub> /PIP <sub>3</sub>	Yes	Positive	(4, 10, 13, 21)
BRAGs	Arf1/Arf6	Anionic lipids	No	None	(16)
EFA6	Arf1/Arf6	PIP <sub>2</sub> /PS	No	Negative	(23, 26, 33; this work)

Padovani et al.

PNAS | August 26, 2014 | vol. 111 | no. 34 | 12381



Negative and positive feedback loops, such as found in EFA6 and cytohesins, are crucial elements that can be coupled to determine the timing and amplitude of various cellular behaviors (reviewed in ref. 43), suggesting the attractive possibility that EFA6 and cytohesins can leverage their regulatory regimes to work in concert. Remarkably, the negative feedback loop in EFA6 would provide a simple solution to the absolute re-quirement of cytohesins for activation by Arf-GTP before their GEF activity is amplified by a positive feedback loop (13) (Fig. 4). Being devoid of constitutive autoinhibition by its PH domain or of a strict requirement for a signaling lipid for its recruitment to the plasma membrane, EFA6 could produce basal levels of Arf6-GTP, with its negative feedback loop working initially as a limiter (Fig. 4, Left). Cytohesins, on recruitment to the plasma membrane induced by an increase in PIP2 or PIP3, could then mobilize this dormant Arf6-GTP pool to trigger their own GEF activity (Fig. 4, Center). The resulting burst in Arf6-GTP and Arf1-GTP production would then concurrently sustain the GEF activity of cytohesins and turn off the GEF activity of EFA6, making cytohesins the major active ArfGEFs at that stage (Fig. 4, *Right*). In this model, EFA6 and Arf6 would have a general (although not necessarily unique) function in tuning the level of cytohesin activity.

The foregoing model involving an ArfGEF circuit with differential activation of Arf1 and Arf6 is supported by certain lines of evidence. Notably, a separation of Arf6 activation and effector functions has been observed in endocytic receptor recycling, in which a dormant pool of Arf6-GTP was observed in clathrin-coated pits that became mobilized only later in fast endocytic events (44). This finding would be consistent with the proposed role of EFA6 in sustaining a basal amount of Arf6-GTP. Likewise, it has been shown that Arf1 and Arf6 have different peaks of activation during phagocytosis, with Arf1 activation delayed and lasting longer than Arf6 activation, although the GEFs involved are unknown (38). Recent work also showed that Arf6 and Arf1 must be activated in sequence for WRC-mediated actin assembly, and that this requires a cytohesin and either EFA6 or BRAG working in concert (45).

It should be noted that a corollary of the feedback circuit model is that expression of dominant active or inactive Arf GTPases or of ArfGEFs and ArfGEF mutants is predicted to interfere with multiple, possibly opposing steps, which should be taken into account when interpreting the resulting phenotypes. Accordingly, the challenge to investigate such feedback circuit will be to find ways to perturb and monitor individual steps separately. Future investigations of the structural mechanism whereby Arf6-GTP and the PH-Ct domain of EFA6 establish the negative feedback loop should be an important step toward this goal.

#### **Experimental Procedures**

Expression and Purification of Recombinant Proteins. Arf1 and Arf6 constructs were expressed in *Escherichia coli*, purified, and, when appropriate, modified by coexpression or in vitro myristoylation and/or loaded with GDP or GTP nucleotides as described previously (16, 34). Cloning,

12382 www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1409832111

expression, and purification of human EFA6A<sup>Sec7</sup> (residues 527–727), EFA6A<sup>Sec7-PH-C1</sup> (residues 527–1024), and EFA6A<sup>PH-C1</sup> (residues 730–1024) are described in *SI Experimental Procedures*. EFA6<sup>PH-C1</sup> and EFA6<sup>Sec7-PH-C1</sup> were further characterized by synchrotron SAXS (Fig. S1A) and by size exclusion chromatography with multiangle light scattering (Fig. S1B), respectively, which demonstrated that the constructs are monomers, and thus the C-terminal domain does not form a homodimeric coiled coil.

Cell Culture, Reagents, and Antibodies. Baby hamster kidney cells (BHK-21) were grown in BHK-21 medium (Gibco-BRL), containing 5% FCS, 10% Tryptose phosphate broth, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mM ι-glutamine. Mouse mAb against the myc epitope (clone 9E10; Roche Diagnostics) was obtained from Jackson ImmunoResearch.

**Liposomes.** All lipids were obtained from Avanti Polar Lipids. Liposomes were prepared as described previously (13) in a buffer containing 50 mM Hepes pH 7.4 and 120 mM potassium acetate. Unless specified otherwise, liposomes contained 34% phosphatidylcholine (PC), 14% phosphatidylethanolamine (PE), 21% phosphatidylserine (PS), 0.7% phosphatidylinositol-4,5-di-phosphate (PIP2), and 30% cholesterol and were extruded through a 0.2- $\mu$ m filter (Whatman).

**Nucleotide Exchange Kinetics.** Nucleotide exchange kinetics were performed by monitoring tryptophan fluorescence ( $\lambda_{exc} = 298$  m;  $\lambda_{exc} = 340$  nm) on a fluorimeter (Cary) equipped with stirring and thermostating devices. Experiments were performed in HKM buffer (50 mM Hepes buffer, pH 7.4, 120 mM potassium acetate, and 1 mM MgCl<sub>2</sub>) supplemented with 1 mM DTT at 37 °C. Pseudofirst-order rate constants ( $k_{obs}$ ) were obtained by fitting the kinetic traces with exponential functions, except for EFA6<sup>5ec7,PH-CI</sup> and <sup>myr</sup>Arf6, which had more complex kinetics, values were derived from initial velocities as described in *SI Experimental Procedures*.  $k_{cat}/K_M$  values were determined from  $k_{obs}$  measured over a range of GEF concentrations, as 100–200  $\mu$ M, at which the protein/lipid ratio is sufficiently high for most of the lipid surface to remain accessible to the proteins (13).

Binding Experiments. Equilibrium dissociation constants (K<sub>d</sub>) of IP<sub>3</sub> to EFA6<sup>PH-CI</sup> or EFA6<sup>Sec7,PH-CI</sup> were determined from the decrease in fluorescence emission at 340 nm by fitting the following equation:  $\Delta F_{3d0nm} = \Delta F_{max} \times [L]/(K_d + [L], where [L] is the concentration of IP<sub>3</sub>. For pull-down experiments, BHK-21 cells were transfected with plasmids encoding C-terminally myc-tagged Arf6Q67L or Arf6T157N, using Jet Pei reagent. After 24 h, cells were lysed in 50 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% glycerol, 1% Triton-X100, 2 mM DTT, and a mixture of protease inhibitors (Roche), and then centrifuged at 15,000 × g for 10 min at 4 °C. Supernatants were incubated with 2 <math>\mu$ M GST constructs in the presence of 0.75% BSA and glutathione Sepharose beads overnight at 4 °C. The beads were then washed, and bound proteins were eluted using SDS sample buffer and separated on SDS/PAGE.

The presence of Arf6 in the eluate was detected by Western blot analysis using the anti-tag antibodies. For cosedimentation experiments, purified A13Arf6-GTP (1.5 µM) and EFA6<sup>PH-CT</sup> proteins (0.5 µM) were incubated with sucrose-loaded fluorescent liposomes (34.3% PC, 14% PE, 21% PS, 0.7% PIP<sub>2</sub>, 30% cholesterol, and 0.2% NBD-PE) extruded on a 0.2-µm filter. Liposomes were sedimented for 20 min at 400,000 × g, checked by fluorescence using a FujiLAS 3000 imager equipped with a CCD camera, and analyzed on 15% SDS/PAGE stained with Sypro-orange and by Western blot analysis with the 1D9 anti-Arf monoclonal antibody (Thermo Fisher Scientific).

Padovani et al.

- 1. Cherfils J, Zeghouf M (2013) Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. Physiol Rev 93(1):269-309
- Cherfils J, Zeghouf M (2011) Chronicles of the GTPase switch. Nat Chem Biol 7(8): 493-495
- Rehmann H, Das J, Knipscheer P, Wittinghofer A, Bos JL (2006) Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* 439(7076): 625-628.
- 4. DiNitto JP, et al. (2007) Structural basis and mechanism of autoregulation 3-phosphoinositide-dependent Grp1 family Arf GTPase exchange factors. Mol Cell 28(4):569-583
- Amor JC, et al. (2005) The structure of RalF, an ADP-ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor from Legionella pneumophila, reveals the presence of a cap over the active site. J Biol Chem 280(2):1392-1400
- a tap over the active site: J biol Cleff 2002, 1322-1400.
  b VB, et al. (2010) Structural and energetic mechanisms of cooperative autoinhibition and activation of Vav1. Cell 140(2):246–256.
  c. Iwig JS, et al. (2013) Structural analysis of autoinhibition in the Ras-specific exchange factor RasGRP1. eLife 2:e00813.
- 8. Gureasko J, et al. (2010) Role of the histone domain in the autoinhibition and activation of the Ras activator Son of Sevenless. Proc Natl Acad Sci USA 107(8):3430-3435.
- Sondermann H, et al. (2004) Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless. *Cell* 119(3):393–405.
   Malaby AW, van den Berg B, Lambright DG (2013) Structural basis for membrane
- recruitment and allosteric activation of cytohesin family Arf GTPase exchange factors. Proc Natl Acad Sci USA 110(35):14213-14218.
- Folly-Klan M, et al. (2013) A novel membrane sensor controls the localization and ArGEF activity of bacterial RalF. *PLoS Pathog* 9(11):e1003747.
   Margarit SM, et al. (2003) Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP
- of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 112(5):685–695. 13. Stalder D, et al. (2011) Kinetic studies of the Arf activator Arno on model membranes
- Statiet D, et al. (2017) Kneets studies of the Art activator Anno on induer inemotiones in the presence of Arf effectors suggest control by a positive feedback loop. J Biol Chem 266(5):3873–3883.
   Richardson BC, McDonold CM, Fromme JC (2012) The Sec7 Arf-GEF is recruited to the
- Instantability of the positive feedback. Dev Cell 22(4):799-810.
   Medina F, et al. (2013) Activated RhoA is a positive feedback regulator of the Lbc family of Rho guanine nucleotide exchange factor proteins. J Biol Chem 288(16): 11325–11333.
- Aizel K, et al. (2013) Integrated conformational and lipid-sensing regulation of 16.
- endosomal ArfGEF BRAG2. PLoS Biol 11(9):e1001652. Cabrera M, et al. (2014) The Mon1-Cc21 GEF activates the Rab7 GTPase Ypt7 via a longin-fold-Rab interface and association with PI3P-positive membranes. J Cell Sci 127(Pt 5):1043-1051.
   D'Souza-Schorey C, Chavrier P (2006) ARF proteins: Roles in membrane traffic and
- beyond, Nat Rev Mol Cell Biol 7(5):347-358.
- Donaldson JG, Jackson CL (2011) ARF family G proteins and their regulators: Roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(6):362–375.
   Casanova JE (2007) Regulation of Arf activation: The Sec7 family of guanine nucle-otide exchange factors. *Traffic* 8(11):1476–1485.
- 21. Cohen LA, et al. (2007) Active Arf6 recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding
- Comer DS, et al. (2007) Active And recourds Antorey Gonesin Cers to the PM by binding their PH domains. Mol Biol Cell 18(6):2244–2253.
   Jian X, Gruschus JM, Sztul E, Randazzo PA (2012) The pleckstrin homology (PH) domain of the Arf exchange factor Brag2 is an allosteric binding site. J Biol Chem 287(29):24273-24283.
- 23. Franco M, et al. (1999) EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. EMBO J 18(6): 1480-149
- 24. Macia E, Partisani M, Paleotti O, Luton F, Franco M (2012) Arf6 negatively controls the rapid recycling of the β2 adrenergic receptor. J Cell Sci 125(Pt 17):4026-4035

(Centre National de la Recherche Scientifique, Valbonne, France) for a critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (to J.C. and D.P.), from the Fondation pour la Recherche Médicale (to M.F.-K.), and from the Agence Nationale de la Recherche (to J.C.).

- 25. Cronin TC, DiNitto JP, Czech MP, Lambright DG (2004) Structural determin phosphoinositide selectivity in splice variants of Grp1 family PH domains. EMBO J 23(19):3711–3720.
- Derrien V, et al. (2002) A conserved C-terminal domain of EFA6-family ARF6-guanine nucleotide exchange factors induces lengthening of microvilli-like membrane pro-trusions. J Cell Sci 115(Pt 14):2867–2879.
   Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG (2001) Phosphatidylinositol
- Jown PP, Nozele AR, Hin HL, Bala F, Outason JG (2001) Phosphatughinositio 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol* 154(5):1007–1017. Klein S, Partisani M, Franco M, Luton F (2008) EFA6 facilitates the assembly of the tight junction by coordinating an Arf6-dependent and -independent pathway. *J Biol* in the second 28. Chem 283(44):30129-30138. 29. O'Rourke SM. Christensen SN. Bowerman B (2010) Caenorhabditis elegans EFA-6
- limits microtubule growth at the cell cortex. *Nat Cell Biol* 12(12):1235-1241. 30. Choi S, et al. (2006) ARF6 and EFA6A regulate the development and maintenance
- of dendritic spines. J Neurosci 26(18):4811-4819.
- Vitalian R, et al. (2005) Paraneoplastic encephalitis, psychiatric symptoms, and hypoventilation in ovarian teratoma. *Ann Neurol* 58(4):594–604.
   Li M, et al. (2006) EFA6A enhances glioma cell invasion through ADP ribosylation
- factor 6/extracellular signal-regulated kinase signaling. Cancer Res 66(3):1583-1590. Macia E, et al. (2008) The pleckstrin homology domain of the Arf6-specific exchange factor EFA6 localizes to the plasma membrane by interacting with phosphatidylino-sitol 4,5-bisphosphate and F-actin. J Biol Chem 283(28):19836–19844.
   Padovani D, Zeghour M, Traverso A, Giglione C, Cherfils J (2013) High-yield pro-
- duction of myristoylated Arf6 small GTPase by recombinant N-myristoyl transferase. Small GTPases 4(1):3-8.
  35. Zeeh JC, et al. (2006) Dual specificity of the interfacial inhibitor brefeldin a for arf
- proteins and sec7 domains. J Biol Chem 281(17):11805-11814.
- 36. Ménétrey J. Macia E. Pasqualato S. Franco M. Cherfils J (2000) Structure of Arf6-GDP suggests a basis for guanine nucleotide exchange factor specificity. Nat Struct Biol 7(6):466–469.
- 37. Macia E, Chabre M, 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(27):24925-24930.
- Beemiller P, Hoppe AD, Swanson JA (2006) A phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signal transition regulates ARF1 and ARF6 during Fcgamma receptor-mediated 38. phagocytosis. PLoS Biol 4(6):e162.
- Buosi V, et al. (2010) Insight into the role of dynamics in the conformational switch of the small GTP-binding protein Ar11. *J Biol Chem* 285(49):37987–37994.
   Biou V, et al. (2010) SAXS and X-ray crystallography suggest an unfolding model for an analysis of the statement of the statem
- the GDP/GTP conformational switch of the small GTPase Arf6. J Mol Biol 402(4): 696-707
- 41. R enault L, Guibert B, Cherfils J (2003) Structural snapshots of the mechanism and Kenault L, Guibert B, Chernis J (2003) structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* 426(6966):525–530.
   Klein S, Franco M, Chardin P, Luton F (2006) Role of the Arf6 GDP/GTP cycle and Arf6
- GTPass-activating proteins in action record line and out of the record of Science 322(5900):390-395
- 44. Montagnac G, et al. (2011) Decoupling of activation and effector binding underlies
- ARF6 priming of fast endocytic recycling. *Curr Biol* 21(7):574–579.
   Humphreys D, Davidson AC, Hume PJ, Makin LE, Koronakis V (2013) Arf6 coordinates actin assembly through the WAVE complex, a mechanism usurped by Salmonella to invade host cells. Proc Natl Acad Sci USA 110(42):16880-16885.
- Béraud-Dufour S, et al. (1998) A glutamic finger in the guarine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg2<sup>\*</sup> and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1. EMBO J 17(13):3651-3659

Padovani et al.

PNAS | August 26, 2014 | vol. 111 | no. 34 | 12383

# SANG SANG SANG SANG

# **Supporting Information**

#### Padovani et al. 10.1073/pnas.1409832111 SI Experimental Procedures

**Expression and Purification of Recombinant Proteins.** Human EFA6A<sup>Sec7</sup> (residues 527–727) and EFA6A<sup>Sec7</sup>-PH-Ct (residues 527–1024) were cloned into a pProEX HTb plasmid with an N-terminal 6-His tag and tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site. Both constructs were overexpressed in *Escherichia coli* and purified essentially as described previously for EFA6A<sup>Sec7-PH-Ct</sup> (1), except that the 6-His tag was removed by TEV protease treatment (1 mg TEV/10 mg proteins, overnight at 4 °C) before the ion-exchange chromatography step

EFA6A<sup>det</sup> (1), except that the 6-His tag was removed by TEV protease treatment (1 mg TEV/10 mg proteins, overnight at 4 °C) before the ion-exchange chromatography step. Different vectors were used for EFA6A<sup>PH-CI</sup> (residues 730–1024).
For use in nucleotide exchange experiments, EFA6A<sup>PH-CI</sup> with an N-terminal 6-His tag was cloned into pET8C (Novagen) and purified by affinity chromatography on a HisTrap FF column, followed by ion-exchange chromatography on a MonoS column (GE Healthcare). For use in binding and structural experiments, the same sequence with an N-terminal 6-His tag and a TEV cleavage site was subcloned by recombination into the Gateway pDEST17 vector (Invitrogen). The recombinant protein was produced in Rosetta(DE3)pLysS *E. coli* strains and purified by nickel-affinity chromatography followed by cleavage using TEV protease, followed by a second nickel-affinity chromatography to remove the recombinant TEV protease and then a final gel filtration step using a Superdex 200 16/600 (GE Healthcare) equilibrated with buffer (10 mM Hepes pH 7.5 and 500 mM NaCl). For pull-down experiments, EFA6A<sup>PH-Ct</sup> was fused to GST and purified from bacteria according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). After elution with glutathione, the purified proteins were dialyzed against 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, and 10% glycerol (dialysis buffer), and then stored at -20 °C.

**Determination of**  $k_{obs}$  from Initial Velocities. For EFA6<sup>Sec7-PH-Ct</sup> and <sup>myr</sup>Arf6, initial velocities  $v_i$  ( $\Delta F_{340nm}.s^{-1}$ ) were determined and transformed into  $k_{obs}$  (s<sup>-1</sup>) using a  $\Delta \epsilon$  value (mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) calculated for each independent experiment from the  $\Delta F_{max}$  and the concentration of <sup>myr</sup>Arf6.

 Padovani D, Zeghouf M, Traverso JA, Giglione C, Cherfils J (2013) High yield production of myristoylated Arf6 small GTPase by recombinant N-myristoyl transferase. Small GTPases 4(1):3–8.



Fig. S1. Characterization of purified recombinant EFA6 constructs. (A) Synchrotron small-angle X-ray scattering (SAXS) analysis of EFA6<sup>PH-C1</sup> from which the histidine tag has been cleaved. SAXS data were analyzed with FOXTROT software, yielding a radius of gyration of 24 Å, in agreement with an association of the PH and Ct domains in an essentially globular structure. (B) Size-exclusion profile (monitored by refractometry; dark lines) and the molecular masses (calculated from light-scattering and refractometry data; red lines) of EFA6<sup>Sec7-PH-C1</sup>. This analysis yielded a molecular mass of 57.2  $\pm$  0.3 kDa (Rh = 3.46  $\pm$  0.25 nm).

Padovani et al. www.pnas.org/cgi/content/short/1409832111

1 of 4



**Fig. 52.** Sensitivity of EFA6 to membrane composition and curvature. (A) Representative kinetic traces observed for the GDP/GTP exchange of <sup>myr</sup>Arf6-GDP in the presence of EFA6<sup>sec7.PH-C1</sup> on liposomes of various compositions (given in Table 51). (B) Fluorescence emission spectra ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) of EFA6<sup>sec7.PH-C2</sup> (1  $\mu$ M) recorded in HKM buffer supplemented with 1 mM DTT at 20 °C in the presence of increasing concentrations of IP<sub>3</sub> (up to 5  $\mu$ M). The addition of IP<sub>3</sub> induced a quenching of fluorescence as well as a slight red shift. (C) Equilibrium binding constant of IP<sub>3</sub> for EFA6<sup>sec7.PH-C1</sup> and EFA6<sup>PH-C1</sup> determined by fluorescence. A hyperbolic fit to the data gave  $k_{act}$  (IP<sub>3</sub>) = 1.40 ± 0.30  $\mu$ M at 37 °C. (E) The EFA6<sup>sec7.PH-C1</sup> catalyzed exchange reaction of <sup>myr</sup>Arf6-GDP is not sensitive to membrane curvature. The diameter of liposomes is indicated.

Padovani et al. www.pnas.org/cgi/content/short/1409832111

2 of 4



Fig. S3. Effect of the Arg625Val mutation on EFA6<sup>Sec7</sup> catalytic activity. Representative kinetic traces observed for the GDP/GTP exchange reaction of 1  $\mu$ M  $\Delta$ 13Arf6-GDP (*A*) or  $\Delta$ 17Arf1-GDP (*B*) alone or in the presence of EFA6<sup>Sec7</sup> or EFA6<sup>Sec7-R625V</sup> (400 nM in *A*, 1  $\mu$ M in *B*).  $k_{obs}$  values (s<sup>-1</sup>) for  $\Delta$ 13Arf6 are 0.0043 for spontaneous, 0.0117 for EFA6<sup>Sec7</sup>, and 0.0073 for EFA6<sup>Sec7-R625V</sup>.  $k_{obs}$  values or  $\Delta$ 17Arf1 are 0.0007 for spontaneous, 0.0011 for EFA6<sup>Sec7</sup>, and 0.0011 for EFA6<sup>Sec7-R625V</sup>.





Padovani et al. www.pnas.org/cgi/content/short/1409832111

6

3 of 4



Fig. S5. Mechanism of EFA6 regulation by Arf6-GTP. (A)  $\Delta$ 13Arf6-GTP does not compete with  $\Delta$ 13Arf6-GDP. EFA6<sup>Sec7</sup> (500 nM) exchange activity on  $\Delta$ 13Arf6-GTP (does not compete with  $\Delta$ 13Arf6-GDP. (L2  $\mu$ M) was monitored in the presence of increasing concentrations of  $\Delta$ 13Arf6-GTP (up to 5.1  $\mu$ M). The absence of effect indicates that the negative feedback loop does not result from a competition mechanism. (B) <sup>myr</sup>Arf6-GTP is not a substrate of EFA6<sup>Sec7,PH-C1</sup>. EFA6<sup>Sec7,PH-C1</sup> (20 nM) does not stimulate the exchange of GTP for GDP from <sup>myr</sup>Arf6-GTP (0.4  $\mu$ M). GTP-GDP exchange in the presence of 1 mM EDTA (no EFA6) is shown for comparison. (C) EFA6<sup>PH-C1</sup> reverses the negative feedback effect in a dose-dependent manner. Nucleotide exchange experiments were carried out with EFA6<sup>Sec7,PH-C1</sup>, <sup>myr</sup>Arf6-GDP, and liposomes in the presence of increasing concentrations of EFA6<sup>PH-C1</sup>.

#### Table S1. Sensitivity of EFA6<sup>Sec7-PH-Ct</sup> to liposome composition

Liposome	<sup>myr</sup> Arf6-GDP		<sup>myr</sup> Arf1-GDP	
	$k_{\rm obs}$ , s <sup>-1</sup>	Fold increase	$k_{\rm obs}$ , s <sup>-1</sup>	Fold increase
None	0.00135 ± 0.00090	1	0.00037 ± 0.00012	1
PC:PE	0.00477 ± 0.00015	3.5	0.00094 ± 0.00006	2.6
PC:PE:PS	0.1275 ± 0.0162	95	0.0960 ± 0.0057	260
PC:PE:PIP <sub>2</sub>	0.0518 ± 0.0041	38	0.0580 ± 0.0015	157
PC:PE:PS:PIP <sub>2</sub>	0.0650 ± 0.0039	48	0.0230 ± 0.0014	62
PC:PE:PS:CHOL	0.0990 ± 0.0087	73	0.0598 ± 0.0027	162
PC:PE:PS:PIP <sub>2</sub> :CHOL	$0.0789 \pm 0.0065$	59	$0.0275 \pm 0.0014$	75

CHOL, cholesterol.

d

Experiments were carried out using 0.4 µM <sup>myr</sup>Arf6-GDP and 11 nM EFA6<sup>5ec7.PH-Ct</sup> or 0.4 µM <sup>myr</sup>Arf1-GDP and 13 nM EFA6<sup>5ec7.PH-Ct</sup>. All values are the average ± SD of three independent experiments. The lipid composition of the liposomes is as follows (% total lipids): PC:PE, PC 80, PE 20; PC:PE:PS, PC 50, PE 20, PS 30; PC:PE:PS, PC 78, PE 20, PIP<sub>2</sub> 2; PC:PE:PS:PIP<sub>2</sub>, PC 48, PE 20, PS 30, PIP<sub>2</sub> 2; PC:PE:PS:CHOL, PC 35, PE 14, PS 21, CHOL 30; PC:PE:PS:PIP<sub>2</sub>: CHOL, PC 34.3, PE 14, PS 21, PIP<sub>2</sub> 0.7, CHOL 30.

# D. Conclusion

Dans cette étude menée par l'équipe du Dr Cherfils et à laquelle j'ai pu participer, nous avons pu mettre en évidence que, contrairement au facteur d'échange ARNO, le domaine PH d'EFA6 ne possède pas d'effet inhibiteur sur son activité catalytique. Par ailleurs, nous avons constaté que sa présence potentialisait l'échange nucléotidique d'Arf6 myristylée catalysée par le domaine Sec7 sur des vésicules composées de PIP2 et de PS. De manière intéressante, nous avons également mis en évidence que l'activité catalytique de la protéine EFA6 est inhibée par son produit Arf6-GTP. Arf6-GTP, le produit de la réaction catalysée par EFA6, va réguler négativement l'activité de ce dernier en interagissant avec son domaine PH-Cterminal.

L'ensemble de ces résultats a permis de proposer un modèle selon lequel EFA6 serait régulé par un rétrocontrôle négatif induit par l'interaction de son produit Arf6-GTP avec son domaine PH-C-terminal.

Les boucles de rétrocontrôle positif et négatif, comme celles régulant l'activité d'ARNO et d'EFA6, sont des phénomènes essentiels et nous pouvons imaginer qu'ils peuvent être couplés pour contrôler différentes voies de signalisation au sein des cellules. Dans notre modèle, EFA6 serait capable d'activer un pool d'Arf6 qui viendrait exercer un rétrocontrôle et inhiber son activité. Lorsque la protéine ARNO serait recrutée à la membrane plasmique, ce pool d'Arf6-GTP viendrait lever son auto-inhibition et ainsi permettre l'activation des protéines Arf1 et Arf6. Ce phénomène amplifierait l'effet activateur sur ARNO et l'inhibition sur EFA6 induite par Arf6-GTP. Dans ce modèle EFA6 et Arf6 serviraient à l'activation d'ARNO qui deviendrait le facteur d'échange le plus actif dans ces conditions.

Toutefois il serait intéressant d'approfondir ces résultats et de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels Arf6-GTP et le domaine PH-C-terminal exercent leur effet inhibiteur.

119

# III. Mécanismes de régulation du facteur d'échange EFA6

## A. Introduction

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, les récepteurs couplés aux protéines G, suite à leur activation par leur ligand spécifique vont contrôler plusieurs voies de signalisation par l'intermédiaire de leurs protéines G hétérotrimériques. Cependant, afin que cette activation et la cascade de signalisation induite ne perdurent pas dans la cellule, les RCPGs activés vont être internalisés. Une fois internalisés les récepteurs vont être emmenés au niveau de compartiments intracellulaires endosomaux. Ils vont pouvoir être ensuite soit recyclés rapidement vers la membrane plasmique à partir des endosomes précoces, soit plus tardivement à partir des endosomes de recyclage. Sous stimulation prolongée par un agoniste ces récepteurs vont être dirigés vers les lysosomes et la voie de dégradation. La signalisation de ces récepteurs est un processus finement régulé au sein de la cellule. Cette régulation fait tout d'abord intervenir une protéine kinase de la famille des GRK. Les GRKs appartiennent à la famille des Sérine/Thréonine kinases et vont phosphoryler les RCPGs suite à leur activation. Cette phosphorylation va permettre d'augmenter l'affinité de ces récepteurs avec un deuxième acteur clé de leur désensibilisation : les arrestines. Les βarrestines, qui sont ubiguitaires, ainsi recrutées vont permettre dans un premier temps le découplage entre le récepteur et les protéines G hétérotrimériques. Dans un deuxième temps les  $\beta$ -arrestines vont permettre le couplage des récepteurs à internaliser avec la machinerie d'endocytose. En effet grâce à la libération de leur extrémité C-terminal induite par l'interaction avec les RCPGs activés, elles sont capables d'interagir avec la protéine adaptatrice AP-2 et la clathrine et ainsi permettre le recrutement des RCPGs dans les puits recouverts de clathrine. Une étude menée au laboratoire a également mis en évidence que les β-arrestines, via leur domaine C-terminal, interagissent de manière simultanée avec EFA6 et Arf6-GDP suite à l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique. Cette interaction est dépendante du ligand et facilite l'activation d'Arf6 par EFA6.

Pendant la dernière partie de ma thèse je me suis donc intéressée à la régulation des interactions protéine-protéine dans ce complexe à trois partenaires que sont EFA6, Arf6 et la

121

 $\beta$ -arrestine afin de mieux comprendre le rôle d'EFA6 et d'Arf6 dans le processus d'internalisation.

# B. Matériel et méthodes

# 1. <u>Culture cellulaire et transfection</u>

Les cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney) sont cultivées dans du milieu de culture BHK-21 (Gibco-BRL), contenant 5% de sérum de veau foetal, 10% de tryptose phosphate broth, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2 mM de L-glutamine.

Ces cellules sont ensuite transfectées transitoirement avec les plasmides codant pour les protéines d'intérêt à l'aide des agents de transfection Jet Pei (Polyplus transfection, Illkirch, France) ou Fugene 6 (Roche) comme décrit par les fournisseurs.

# 2. <u>Réactifs et anticorps</u>

Le GTPγS[<sup>35</sup>S] provient de Perkin Elmer et les Azolectines de Sigma Chemical (St Louis, MO).

Les anticorps suivant ont été utilisés: l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope VSV-G (clone P5D4; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope HA (clone 12CA5; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), l'antisérum de lapin contre la GFP (Clontech), l'anticorps monoclonal de souris anti-His (Sigma), l'anticorps monoclonal de souris anti-Arf6 (clone 8A6-2 fourni par S. Bourgoin, Sainte-Foy, Canada). L'anticorps de chèvre anti-βarrestine1 (K16 and C19) et anti-βarrestine2 (C18) proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Heidelberg). L'anticorps secondaire couplé à la Texas-Red vient de Jackson ImmunoResearch (Interchim, France).

# 3. <u>Construction ADN</u>

Les plasmides codant pour le récepteur β2-adrénergique étiqueté GFP et la βarrestin1 nous ont été fournis par C. Moore et J. Benovic (Université Thomas Jefferson, Philadelphie). Les plasmides codant pour les constructions His–PH-C-ter, les différentes constructions d'EFA6 étiquetées vsv-G, GFP–PH-C-ter, GFP-C-ter, His–Arf6 et His-Arf1 ont été précédemment décrits. Les séquences codant les résidus d'EFA6A humain 1–645 (protéine entière); 125–347 (Sec7); 351–645 (PH-Cter); 490–645 (Cter); 490–525 (ProN); 525-600 (CC); 600-645 (ProC);

490-600 (ProN-CC) et 525-645 (CC-ProC) ont été obtenus par PCR et clonés dans un vecteur pGEX-3X (GE Healthcare) pour fusion avec la GST au niveau de l'extréminté N-terminale.

# 4. <u>Production et purification de protéines GST et HisTag</u>

Les différentes constructions couplées à la GST ou possédant une étiquette His sont produites dans des bactéries BL21. Le culot bactérien est récupéré puis resuspendu dans du tampon de lyse froid (Tris pH8 50mM ; NaCl 150mM ; MgCl2 2mM; glycérol 10% [phenylmethylsulphonyl fluoride] PMSF 0.25mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases pour les GST et Tris pH8 50mM ; NaCl 100mM ; MgCl2 1mM;  $\beta$ mercapto ethanol 5mM; glycérol 10%, imidazole 50mM, [phenylmethylsulphonyl fluoride] PMSF 0.25mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases pour les His. La suspension bactérienne est soumise à 2 passages à la Presse de French maintenue à 4°C afin de lyser les bactéries, puis centrifugée. Le surnageant est récupéré et ultracentrifugé à 35.000 rpm pendant 2h à 4°C. Après récupération, le surnageant est incubé avec des billes de Glutathion Sepharose (GST) ou des billes Ni-NTA (His) sur la nuit. Le lendemain les billes sont lavées 3 fois avec du tampon de lyse puis les protéines sont éluées avec du tampon d'élution (tampon de lyse complémenté avec de la Glutathion Sepharose 20mM et NaCl 100mM pour les GST et tampon de lyse avec 200mM imidazole pour les His). 6 fractions de 1ml sont collectées puis analysées sur gel de poly-acrylamide et les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. Les fractions contenant la protéine sont dialysées afin d'éliminer le Glutathion Sepharose puis centrifugées sur Centricon pour concentrer les protéines.

## 5. <u>Pull down sur lysat cellulaire</u>

Après 24h de transfection, les cellules BHK, ensemencées à 2.10<sup>5</sup> cellules dans des boites de Pétri de diamètre 10cm, sont lavées en PBS à froid, lysées par un tampon de pull-down (Tris/HCl pH=8,0 50mM, MgCl2 10mM, NaCl 100mM, Triton X100 1%, glycérol 10%, DTT 2mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases) puis centrifugées 10min à 13200rpm à 4°C. Le lysat cellulaire ainsi obtenu est incubé avec 1µM à 3µM de protéines purifiées étiquetées GST, 0,75% de BSA et des billes de Glutathion Sepharose. Le mélange est ainsi mis sous agitation à 4°C pendant 15h. Les billes sont ensuite lavées deux fois en tampon de lyse puis une fois en PBS et les protéines éluées dans 30µl de tampon dénaturant. Les échantillons

sont mis à bouillir pendant 5min puis déposés sur gel de polyacrylamide et l'interaction des protéines est analysée par western-blot avec les anticorps correspondants.

# 6. <u>Fractionnement cytosol/membrane</u>

Après 24h de transfection, les cellules BHK, ensemencées à 2.10<sup>5</sup> cellules dans des boites de Pétri de diamètre 10cm sont lavées en PBS. Elles sont ensuite récoltées dans 2ml de PBS puis mises à centrifuger 5 minutes à 1500 rpm à 4°C. Puis le culot cellulaire est homogénéisé 5 minutes à 4°C dans un tampon contenant 250 mM de sucrose, 3 mM d'imidazole, pH 7.4, et un mélange d'inhibiteurs de protéases et centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu dans 100µl de tampon d'homogénéisation à l'aide d'une aiguille 0,6 afin de lyser les cellules puis le lysat est mis à centrifuger pendant 5 minutes à 4500rpm à 4°C. Le surnageant dépourvu de noyau PNS (post-nuclear supernatant) est collecté puis ultra-centrifugé dans un rotor Beckman TLA 100.1 pendant 45 minutes à 70000 rpm à 4°C pour séparer les fractions cytosoliques et membranaires. Le surnageant correspondant à la fraction cytosolique est collecté et le culot correspondant à la fraction membranaire est resuspendu dans un volume équivalent. Les échantillons sont ensuite bouillis pendant 5 minutes puis déposés sur gel de polyacrylamide et enfin analysés par coloration au bleu de Coomassie ou par western-blot.

# 7. <u>Sédimentation</u>

3μM de vésicules d'azolectine sont incubées avec 2 à 3 μM de protéines Arf6 gly GDP ou GTP et His-PH-C-ter seul ou ensemble dans un tampon HKM pH 7.5 (Hepes 50mM, KCl 100mM et MgCl<sub>2</sub> 2mM). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les 70μl de mélange sont mis à centrifuger dans un rotor Beckman TLA 100.1 pendant 13 minutes à 70000 rpm à 25°C. Le surnageant et le culot qui a été resuspendu dans 70μl de tampon HKM sont mis à bouillir pendant 5min puis déposés sur gel de polyacrylamide puis analysés par coloration au bleu de Coomassie ou par western-blot.

# 8. <u>Pull down protéines purifiées</u>

De  $0,5\mu$ M à  $3\mu$ M de protéines purifiées possédant une étiquette poly-Histidine sont incubées dans un tampon de lyse (Tris/HCl pH=8,0 50mM, MgCl2 10mM, NaCl 100mM, Triton X100 1%, glycérol 10%, DTT 2mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases) avec  $3\mu$ M

de protéines purifiées couplées à une GST, 0,75% de BSA ainsi que des billes de Glutathion Sepharose pendant 2h30 à 4°C sous agitation. Enfin les billes sont lavées deux fois en tampon de pull-down puis une fois en PBS et les protéines éluées dans 30µl de tampon dénaturant. Les échantillons sont mis à bouillir pendant 5 minutes puis déposés sur gel de polyacrylamide et l'interaction des protéines est analysée par western-blot avec les anticorps correspondants.

#### 9. <u>Cinétiques d'échange nucléotidique radioactif sur les Arf</u>

1,4μM de protéines Arf6 ou Arf1 sont pré-incubées dans un tampon HKM (Hepes 50mM pH 7,5, KCl 100mM et MgCl<sub>2</sub> 1mM) en présence d'azolectine avec 2mM EDTA et 0,5 à 10μM des différentes protéines d'intérêt (GST-C-ter ; GST PH-C-ter et βarrestine) pendant 15 min à température ambiante. La cinétique d'échange spontanée est déclenchée par l'ajout de 100μM de nucléotides radioactifs GTPγS[<sup>35</sup>S] et le mélange est placé à 37°C. Pour chaque temps une aliquote du mélange est prélevé et filtré sur membrane de nitrocellulose afin de déterminer la quantité de protéines Arf liées au GTPγS[<sup>35</sup>S] exprimée en cpm (coups par minute).

Pour l'échange catalysé, la protéine Arf6 (1,4 $\mu$ M) est pré-incubée dans un tampon HKM en présence d'azolectine avec 50nM d'His-EFA6 et/ou 10 $\mu$ M de GST-C-ter pendant 15 minutes à température ambiante. La cinétique est déclenchée par l'ajout de 100 $\mu$ M de nucléotides radioactifs GTP $\gamma$ S[<sup>35</sup>S] et le mélange est placé à 37°C. Pour chaque temps un aliquote du mélange est prélevé et filtré sur membrane de nitrocellulose afin de déterminer la quantité de protéines Arf kiées au GTP $\gamma$ S[<sup>35</sup>S] exprimée en cpm (coups par minute).

## 10. Western blot

Une fois les protéines dénaturées, elles sont séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dans du tampon de migration (Tris 25mM ; Glycine 250 mM; SDS 1%). Suite à la séparation électrophorétique à 27mA constant, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose dans du tampon de transfert (Tris 25Mm; Glycine 192 mM; méthanol 20%) à 4°C pendant 90 minutes à 400mA constant. Un système de transfert liquide est utilisé. La membrane de nitrocellulose (Whatman, Protran, Germany) est saturée pendant 30 minutes dans un tampon PBS contenant 5% de lait écrémé en poudre et 0,1% de Tween 20, à température ambiante et sous agitation. Puis elle est incubée, soit deux heures

à température ambiante, soit durant la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dirigé contre notre protéine d'intérêt. L'anticorps est dilué dans du PBS et du lait à 5%. Une fois l'incubation terminée, la membrane est lavée 4 fois pendant 10 minutes dans du PBSTween et incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la horse-radish peroxydase durant une heure à température ambiante. La membrane est lavée 4 fois pendant 10 minutes et révélée par chemiluminescence (Millipore) associée à un système d'acquisition numérique (LAS-3000, Fuji) et analysée à l'aide d'un logiciel adapté (MultiGauge, Fuji).

## 11. <u>Préparation liposomes</u>

De larges vésicules unilamellaires d'azolectine ont été préparées comme décrit précédemment à une concentration de 20mg/ml.

# 12. Immunofluorescence

Les cellules BHK sont ensemencées sur des lamelles de 11mm de diamètre puis transfectées transitoirement avec les plasmides codant pour C-ter Q600-GFP et/ou vsv-G-EFA6 ou V525-GFP et/ou Arf6-HA. Après 24h de transfection les cellules sont lavées en PBS, fixées en 3% PFA (paraformaldéhyde) pendant 20min, lavées à nouveau et incubées 10 minutes avec du NH4Cl 50mM. Ensuite les cellules sont perméabilisées par la saponine 0,5% et incubées successivement avec les anticorps primaires et secondaires pendant 30min à température ambiante. Vsv-G-EFA6 et Arf6-HA sont révélées par des anticorps monoclonaux spécifiques de souris (P5D4 et 12CA5 respectivement). Les anticorps secondaires couplés au fluorochrome Texas-Red permettent ensuite de visualiser les protéines. Les lamelles sont ensuite montées sur lame puis l'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocale LSM780 (Zeiss).

# C. Résultats

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'interaction entre EFA6 et la  $\beta$ arrestine. Par des expériences de pull-down nous avons voulu déterminer le domaine d'EFA6 impliqué dans cette interaction. Pour cela nous avons utilisé différentes constructions d'EFA6 couplé à la GST: soit la protéine entière, soit les domaines Sec7, C-terminal ou PH-Cterminal isolés (Figure 39A). Ces expériences mettent en évidence que le domaine Cterminal de la  $\beta$ -arrestine est capable d'interagir légèrement avec EFA6 entier et de manière plus importante avec le domaine C-terminal. De manière surprenante on remarque que le domaine PH-C-terminal, qui possède pourtant le domaine C-terminal responsable de l'interaction, n'est pas capable d'interagir avec la  $\beta$ -arrestine (Figure 39B et 39C).

Cette différence d'interaction entre ces deux constructions qui contiennent le domaine Cterminal identifié comme étant le domaine interagissant avec la  $\beta$ -arrestine suggère que le site d'interaction est masqué par la présence du domaine PH.

Ces résultats nous ont amenés à l'hypothèse selon laquelle EFA6 serait capable de former des homodimères. En effet nous pouvons imaginer qu'EFA6 serait capable de se dimériser par l'intermédiaire d'une interaction entre le domaine C-terminal et le domaine PH empêchant ainsi la liaison de le  $\beta$ -arrestine.

Dans le but de tester cette hypothèse nous avons réalisé des expériences de coimmunoprécipitation sur des cellules surexprimant la protéine EFA6 couplée à deux étiquettes différentes. Nous avons pu observer que la protéine EFA6 portant une étiquette GFP n'était pas capable d'immunoprécipiter avec elle la protéine EFA6 couplée à la RFP et inversement. Cette constatation a été confortée par des expériences de gel filtration réalisées par l'équipe du Dr Cherfils, où la présence d'homodimères d'EFA6 n'a pu être observée (communication personnelle).

Ces observations suggèrent fortement la présence d'un repli intramoléculaire au sein de la protéine EFA6 masquant ainsi le site d'interaction présent au niveau du domaine C-terminal pour la  $\beta$ -arrestine.

Dans le but de valider cette hypothèse et nous avons cherché tout d'abord à confirmer cette interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6.

Pour cela nous avons réalisé des expériences de pull-down sur des lysats cellulaires surexprimant soit EFA6 entier soit différents mutants de délétion en présence de GST ou de

128

GST-C-ter. Ces expériences ont mis en évidence que le domaine C-terminal d'EFA6 est capable d'interagir avec toutes les constructions d'EFA6 contenant le domaine PH. En effet on constate que le domaine C-terminal est capable de précipiter avec lui les constructions EFA6 entier, EFA6ΔSec7 et EFA6ΔCter mais pas la construction EFA6ΔPHCter (Figure 40). Ces résultats mettent en évidence que la présence du domaine PH est nécessaire pour l'interaction avec le domaine C-terminal et suggèrent une interaction entre le domaine Cterminal et le domaine PH d'EFA6.

Nous avons, par la suite, effectué une expérience de pull down sur un lysat cellulaire surexprimant le domaine PH d'EFA6. Nous avons pu observer que le domaine C-terminal couplé à la GST est capable de précipiter avec lui le domaine PH alors que la GST seule ne peut pas (Figure 41A). Ces résultats nous ont permis de confirmer l'interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6. Dans une expérience complémentaire nous avons utilisé la propriété du domaine PH à se lier aux phospholipides membranaires alors que le domaine C-terminal se trouve majoritairement dans le cytosol. Nous avons donc réalisé un fractionnement cytosol membrane sur des cellules surexprimant soit le domaine PH, soit le domaine C-terminal soit ces deux domaines. Ainsi nous avons pu observer que le domaine PH se trouve majoritairement dans la fraction liée aux membranes alors que le domaine C-terminal se trouve lui dans la fraction cytosolique. Quand ces deux constructions sont co-transfectées on observe une redistribution d'une fraction du domaine C-terminal de la fraction cytosolique vers la fraction liée aux membranes (Figure 41B). Ces résultats démontrent une interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6 et que cette interaction n'est pas compétitive avec la liaison du domaine PH aux phospholipides. En effet la présence du domaine C-terminal n'est pas capable de dissocier la liaison du domaine PH aux membranes. La capacité du domaine PH à lier simultanément les lipides et le domaine C-terminal suggère que l'ouverture de ce repli intramoléculaire ne régule probablement pas la liaison d'EFA6 à la membrane plasmique.

Par la suite nous avons voulu réduire la zone d'interaction et identifier quelle zone du domaine C-terminal est impliquée dans l'interaction avec le PH. Le domaine C-terminal est composé de deux domaines riches en proline (ProN et ProC) séparés par un domaine coiled-coil (CC). Nous avons réalisé et purifié au laboratoire différentes constructions correspondant aux différents sous domaines du C-terminal couplés à la GST (Figure 41C). Par des expériences de pull-down sur des lysats cellulaires surexprimant le domaine PH d'EFA6,

129

nous avons pu mettre en évidence que le ProN-CC, mais pas le domaine CC-ProC, est capable d'interagir avec le domaine PH (Figure 41D). Nous avons confirmé ce résultat par une expérience de fractionnement sur des cellules BHK surexprimant les domaines PH et ProN-CC (C-ter Q600) seuls ou ensemble. Ainsi, nous avons observé, de manière similaire au domaine C-terminal, que le domaine ProN-CC est majoritairement soluble quand il est exprimé seul et est en partie redistribué dans la fraction membranaire par le domaine PH (Figure 41E). Nous avons également observé que le domaine ProN seul n'est pas redistribué dans la fraction membranaire par le domaine par le domaine pron le domaine PH (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que la combinaison des domaines ProN et CC est nécessaire pour l'interaction avec le domaine PH.

Nous avons également cherché à déterminer si cette interaction était possible dans la cellule. Pour cela nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence sur des cellules BHK surexprimant EFA6 et une partie du domaine C-ter s'arrêtant au résidu Q600 qui correspond au domaine ProN-CC, seuls ou ensemble afin d'étudier leurs localisations. Nous pouvons observer que le domaine ProN-CC (C-ter Q600) a un marquage diffus qui traduit une localisation dans le cytoplasme. Ces résultats sont en accord avec les expériences de fractionnement cytosol/membrane où on retrouvait le domaine C-ter dans la fraction soluble. EFA6, quant à elle, se localise exclusivement à la membrane plasmique et plus précisément dans des replis membranaires appelés «ruffles». Lors de la double transfection nous observons qu'EFA6 garde sa localisation à la membrane plasmique alors que le domaine ProN-CC se trouve en partie redistribué dans les structures enrichies en EFA6 (Figure 42). Ces expériences mettent en évidence qu'EFA6 et le C-terminal sont capables d'interagir au niveau de la membrane plasmique dans la cellule.

Nous avons donc pu mettre en évidence jusqu'ici que le domaine C-terminal d'EFA6 était capable d'interagir via son domaine ProN avec le domaine PH. Nous avons vu que cette interaction masque les sites d'interaction présents au niveau du domaine C-terminal pour au moins un de ces partenaires, la  $\beta$ -arrestine, mais n'interfère pas avec la liaison du domaine PH avec les membranes. L'ensemble de ces résultats suggère fortement la présence d'un repli intramoléculaire au sein du facteur d'échange EFA6.

Durant la suite de ce projet nous nous sommes penchés sur les mécanismes de régulation d'EFA6 et avons cherché à déterminer les facteurs impliqués dans cette régulation et dans l'ouverture de la protéine EFA6. En effet il a été décrit chez ARNO la présence de deux replis intramoléculaires le maintenant dans une conformation inactive. L'ouverture de la protéine fait intervenir différents facteurs dont des phosphorylations et Arf6-GTP, est nécessaire pour obtenir une forme d'ARNO pleinement active. Par analogie avec le facteur d'échange ARNO nous avons étudié le rôle d'Arf6 dans cette régulation.

Dans ce but nous avons réalisé une expérience de sédimentation. Nous avons incubé des vésicules avec du PH-C-ter, de l'Arf6gly-GTP qui correspond à une forme non myristylée donc soluble, ou la combinaison de ces deux protéines et les avons fait sédimenter. Ainsi les protéines associées aux membranes vont se retrouver entrainées dans le culot avec les vésicules. Nous observons dans cette expérience qu'Arf6gly-GTP et le PH-C-ter, comme attendu, se trouvent respectivement dans le surnageant et dans le culot. De plus quand ces deux protéines sont incubées ensemble, nous constatons, comme mentionné précédemment dans l'étude réalisée en collaboration avec le Dr Cherfils, qu'une petite fraction d'Arf6gly-GTP sédimente avec les vésicules montrant une légère interaction entre ces deux partenaires (Figure 43). Nous avons ensuite cherché à déterminer si cette interaction est nucléotide dépendante et avons réalisé cette expérience en présence également d'Arf6-GDP. Comme pour Arf6-GTP nous observons qu'une fraction d'Arf6-GDP est redistribuée dans le culot en présence de PH-C-ter. Ces résultats confirment une interaction entre le PH-C-Ter et Arf6. Cette interaction semble être spécifique des nucléotides puisque nous constatons que la fraction relocalisée est plus importante pour la forme GDP que pour la forme GTP (Figure 44).

Par la suite nous avons voulu déterminer si cette interaction se fait par l'intermédiaire du domaine C-terminal ou du domaine PH. Pour cela nous avons réalisé des expériences de pull-down en solution à l'aide de protéines purifiées. Nous avons testé l'interaction entre les formes GDP et GTP d'Arf6 et les domaines C-terminal et PH-C-terminal. On observe dans ces conditions plus stringentes, où la composition en sels est différente et où le pH augmenté, que nous ne retrouvons pas les résultats obtenus précédemment. En effet nous constatons ici que la forme GTP d'Arf6 n'est capable d'interagir ni avec le domaine C-terminal ni avec le domaine PH-C-terminal. En revanche la forme GDP elle, interagit faiblement avec le domaine PH-C-terminal et de manière plus forte avec le domaine C-terminal (Figure 45). L'ensemble de ces résultats mettent en évidence une interaction entre EFA6 et son substrat se faisant par un autre domaine que le domaine catalytique. En effet nous avons pu constater la présence d'un site d'interaction présent sur le domaine C-terminal pour la petite protéine G

Arf6, et plus spécifiquement pour la forme GDP. De manière similaire à la  $\beta$ -arrestine, ce site d'interaction est masqué par la présence du domaine PH.

Cette interaction entre le domaine C-terminal et Arf6 étant spécifique du nucléotide, nous avons cherché à déterminer son rôle sur l'échange nucléotidique d'Arf.. Bien que l'échange nucléotidique d'Arf6 soit catalysé par EFA6, la réaction peut se faire plus lentement de manière spontanée. La diminution de la concentration du MgCl<sub>2</sub> libre dans le milieu va accélérer cette réaction en déstabilisant le GDP favorisant ainsi la liaison du GTPyS en excès dans le milieu. Ainsi nous avons pu étudier les effets des domaines C-terminal et PH-Cterminal sur cet échange spontané. Nous avons pu constater que la présence du PH-Cterminal n'influence pas l'échange nucléotidique d'Arf6. En revanche la présence du domaine C-terminal à concentration équivalente bloque totalement la liaison d'Arf6 au GTPyS (Figure 46). Cet effet inhibiteur du domaine C-terminal sur la cinétique d'échange nucléotidique d'Arf6 se fait de manière dose dépendante (Figure 47). De manière similaire à l'échange nucléotidique spontané, celui catalysé par EFA6 est également inhibé par la présence du domaine C-terminal. En effet on observe lors de la l'échange nucléotidique catalysé en présence du domaine C-terminal que la vitesse initiale semble peu affectée mais que le plateau est diminué suggérant que le domaine C-terminal piège une fraction d'Arf6-GDP la rendant incapable de lier le GTP (Figure 48). Ces résultats confirment donc l'interaction entre le domaine C-terminal et Arf6-GDP et mettent en évidence que cette dernière est inhibée par la présence du domaine PH.

Par la suite nous avons cherché à déterminer si cet effet du domaine C-terminal était spécifique de l'isoforme Arf6. Pour cela nous avons suivi la liaison spontanée d'Arf1-GDP et d'Arf6-GDP au GTPγS en présence ou non d'une concentration équivalente de domaine C-terminal. Ces expériences montrent qu'à faible concentration de MgCl<sub>2</sub> Arf1 se lie spontanément au GTPγS de manière équivalente à Arf6. En revanche la présence du domaine C-terminal d'EFA6 n'affecte pas l'échange nucléotidique de ce dernier alors qu'il inhibe celui d'Arf6 (Figure 49).

L'ensemble des résultats obtenus a mis en évidence que le domaine C-terminal d'EFA6 interagit spécifiquement avec Arf6-GDP bloquant l'activation de cette dernière.

Nous avons par la suite cherché à identifier le sous domaine du C-terminal impliqué dans l'interaction avec Arf6-GDP. Pour cela nous avons réalisé des expériences de pull down à l'aide des différents sous-domaines du C-terminal seuls ou combinés. Nous avons utilisé les

constructions correspondant au domaine ProN, CC et ProC ainsi que les constructions ProN-CC et CC-ProC. Nous avons pu observer que le domaine C-terminal entier et les constructions ProN et ProN-CC sont capables de précipiter avec elles la protéine Arf6-GDP contrairement à la GST et aux constructions CC, ProC et CC-ProC elles ne précipitent Arf6-GDP (Figure 50). Ces expériences ont mis en évidence que l'ensemble des constructions possédant le domaine ProN sont capables d'interagir avec Arf6-GDP et le domaine ProN seul est suffisant pour permettre cette interaction.

De plus, par des expériences d'immunofluorescence nous avons voulu confirmer cette interaction entre Arf6 et le domaine ProN au niveau de la cellule. Nous avons donc étudié la localisation de ces protéines dans des cellules BHK surexprimant Arf6-HA et une construction du C-terminal correspondant au domaine ProN (Cter V525-GFP). Nous remarquons que le domaine ProN possède une localisation cytosolique. Arf6 se localise principalement au niveau de la membrane plasmique dans des microvillosités. En revanche, on constate quand elles sont co-exprimées, que le domaine ProN se trouve en partie redistribué au niveau de la membrane plasmique dans des structures enrichies en Arf6 (Figure 51).

Ces résultats suggèrent que cette interaction entre Arf6-GDP et le domaine C-terminal d'EFA6 peut également avoir lieu au sein de la cellule.


### Figure 39: La présence du domaine PH inhibe l'interaction entre le domaine C-terminal et la β-arrestine.

A) Schéma représentatif d'EFA6 et des différentes constructions couplées à la GST utilisées dans cette étude.

B) GST pull-down sur protéines purifiées. La protéine His- $\beta$ arrestine est incubée en présence de billes de Glutathion Sepharose avec les différentes constructions d'EFA6 couplées à la GST.

C) Pull-down réalisé sur des cellules BHK transfectées transitoirement avec la  $\beta$ arrestine. Le lysat cellulaire est incubé avec les protéines GST, GST-C-ter et GST PH-C-ter en présence de billes de Glutathion Sépharose.

Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par les anticorps correspondants. Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.



#### Figure 40: Le domaine C-terminal d'EFA6 interagit avec toutes les constructions possédant le domaine PH d'EFA6

Pull-down réalisé sur des cellules BHK transfectées transitoirement avec différentes constructions d'EFA6 possédant une étiquette vsv-G. Le lysat cellulaire est incubé avec les protéines GST et GST-C-ter en présence de billes de Glutathion Sépharose.

Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-vsv-G (P5D4). Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.



## Figure 41: Le domaine C-terminal d'EFA6 interagit avec le domaine PH d'EFA6 via sa région

#### ProN-CC

A) Pull-down réalisé sur des cellules BHK transfectées transitoirement avec le domaine PH d'EFA6 couplé à la GFP. Le lysat cellulaire est incubé avec les protéines GST ou GST-Cter en présence de billes de Glutathion Sépharose.

B et E) Fractionnement cytosol-membrane réalisé sur des cellules BHK transfectées avec le domaine PH, le domaine Cter ou Cter Q600 seul ou ensemble couplés à la GFP. Les protéines d'intérêt présentes dans les différentes fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti GFP.

C) Représentation schématique du domaine C-terminal d'EFA6 et des différentes constructions couplées à la GST utilisées dans cette étude.

D) Pull-down réalisé sur des cellules BHK transfectées transitoirement avec le domaine PH d'EFA6 couplé à la GFP. Le lysat cellulaire est incubé avec les protéines GST, GST-Cter ou les différentes constructions du domaine C-terminal couplées à la GST en présence de billes de Glutathion Sépharose.

Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-vsv-G (P5D4). Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.





co-exprimés



#### Figure 42: EFA6 colocalise avec le domaine ProN-CC dans la cellule

Expérience d'immunofluorescence réalisée sur des cellules BHK transfectées avec le C-ter Q600-GFP (correspondant au domaine ProN-CC) et vsv-G-EFA6 seuls ou ensemble pendant 24H et révélé avec un anticorps anti vsv-G (P5D4). Les flèches indiquent une colocalisation.



#### Figure 43: Le domaine PH-C-terminal d'EFA6 interagit avec Arf6-GTP

Les protéines His-PH-Cter et Arf6GTP sont incubées seules ou ensemble avec ou sans vésicules lipidiques artificielles (azolectine) puis le mélange est ultra centrifugé. La fraction soluble est collectée et le culot est resuspendu dans un volume équivalent puis collecté. Ces deux fractions sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE. Les protéines d'intérêt sont ensuite révélées par une coloration au bleu de Coomassie ou transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-Arf6.



#### Figure 44: Le domaine PH-C-terminal d'EFA6 interagit préférentiellement avec Arf6-GDP

Les protéines His-PH-Cter, Arf6GTP et Arf6-GDP sont incubées seules ou ensemble avec vésicules lipidiques artificielles (azolectine) puis le mélange est ultra centrifugé. La fraction soluble est collectée et le culot est resuspendu dans un volume équivalent puis collecté. Ces deux fractions sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE. Les protéines d'intérêt sont transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par les anticorps correspondants.



## <u>Figure 45: De manière similaire à la $\beta$ -arrestine, Arf6-GDP interagit avec le domaine C-</u> <u>terminal mais pas le domaine PH-C-terminal d'EFA6</u>

GST pull-down sur protéines purifiées. Les protéines Arf6-GDP ou Arf6GTP sont incubées en présence de billes de Glutathion Sepharose avec les protéines GST Cter ou GST PH-Cter. Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-Arf6. Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.



# Figure 46: L'échange spontané GDP/GTP sur Arf6 est inhibée spécifiquement par le domaine C-terminal d'EFA6

Cinétique de liaison spontanée d'Arf6 non myristylé (1,4 $\mu$ M) au GTP $\gamma$ S[<sup>35</sup>S] seul ou en présence des domaines Cter ou PH-Cter (1 $\mu$ M). Les expériences sont réalisées en présence de vésicules lipidiques artificielles (azolectine) et la quantité d'Arf6 liée au GTP $\gamma$ S est déterminée pour chaque temps par filtration sur membrane de nitrocellulose et est exprimée en cpm (coups par minute).



## Figure 47: Le domaine C-terminal d'EFA6 inhibe l'échange nucléotidique spontané d'Arf6-

#### GDP de manière dose dépendante

Cinétique de liaison spontanée d'Arf6 non myristylé  $(1,4\mu M)$  au GTP $\gamma$ S[<sup>35</sup>S] seul ou en présence de différentes concentration en domaine Cter (0,2 ou 1 $\mu$ M). Les expériences sont réalisées en présence de vésicules lipidiques artificielles (azolectine) et la quantité d'Arf6 liée au GTP $\gamma$ S est déterminée pour chaque temps par filtration sur membrane de nitrocellulose et est exprimée en cpm (coups par minute).



# Figure 48: Le domaine C-terminal d'EFA6 inhibe l'échange nucléotidique d'Arf6-GDP catalysée par EFA6

Cinétique de liaison spontanée d'Arf6 non myristylé (1,4 $\mu$ M) au GTP $\gamma$ S[<sup>35</sup>S] seul ou en présence d'EFA6 (200nM) et du domaine Cter (10 $\mu$ M) seul ou ensemble. Les expériences sont réalisées en présence de vésicules lipidiques artificielles (azolectine) et la quantité d'Arf6 liée au GTP $\gamma$ S est déterminée pour chaque temps par filtration sur membrane de nitrocellulose et est exprimée en cpm (coups par minute).



# Figure 49: Le domaine C-terminal d'EFA6 inhibe spécifiquement l'échange nucléotidique spontané d'Arf6-GDP

# Cinétique de liaison spontanée d'Arf6 et d'Arf1 non myristylé (1,4 $\mu$ M) en GTP $\gamma$ S[<sup>35</sup>S] seul ou en présence du domaine Cter (1 $\mu$ M). Les expériences sont réalisées en présence d'azolectine et la quantité d'Arf6 et d'Arf1 liée au GTP $\gamma$ S est déterminée pour chaque temps par filtration sur membrane de nitrocellulose et est exprimée en cpm (coups par minute).



## <u>Figure 50: Le domaine C-terminal d'EFA6 interagit directement avec Arf6-GDP par</u> <u>l'intermédiaire de son extrémité ProN</u>

A) Schéma représentatif du domaine C-terminal d'EFA6 et des différentes constructions couplées à la GST utilisées dans cette étude.

B) GST pull-down sur protéines purifiées. La protéine Arf6-GDP est incubée en présence de billes de Glutathion Sepharose, avec les différentes constructions du domaine C-terminal couplées à la GST.

Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-Arf6 (8A6-2). Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.

seuls



co-exprimés



# Figure 51: Arf6 et le domaine ProN colocalise dans la cellule au niveau de la membrane plasmique

Expérience d'immunofluorescence réalisée sur des cellules BHK transfectées avec le Cter V525-GFP (correspondant au domaine ProN) et Arf6-HA seuls ou ensemble pendant 24H et révelées avec un anticorps anti HA. Les flèches indiquent une colocalisation.

#### D. Conclusion

EFA6 appartient à la famille des protéines à domaine Sec7 qui sont des facteurs d'échange pour les petites protéines G de la famille Arf. Il existe 4 isoformes de la protéine EFA6 chez l'humain (EFA6A, EFA6B, EFA6C et EFA6D) qui partagent une organisation commune. Ils possèdent un domaine N-terminal dont la fonction reste à déterminer, un domaine Sec7 qui est le domaine catalytique, un domaine PH capable d'interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique et un domaine C-terminal qui permet l'interaction avec différents partenaires. EFA6 est impliqué dans différents processus biologiques tels que la réorganisation du cytosquelette d'actine, l'internalisation et le recyclage de différentes protéines membranaires mais également dans la mise en place de la polarité épithéliale. Ainsi une étude précédemment menée au laboratoire à mis en évidence que suite à l'activation par un agoniste du récepteur 22-adrénergique, la 2-arrestine va pouvoir interagir avec EFA6 et son substrat Arf6-GDP et faciliter l'échange nucléotidique Arf6-GDP/Arf6-GTP catalysé par EFA6. Dans cette étude des mécanismes de régulation de la protéine EFA6 nous avons pu mettre en évidence que l'interaction entre la 2-arrestine et EFA6 se faisait par l'intermédiaire du domaine C-terminal d'EFA6. Néanmoins nous avons observé qu'on « perdait » cette interaction lors de nos expériences avec la construction PH-C-terminal. Des résultats préliminaires obtenus en collaboration nous poussent à penser que cet effet inhibiteur du domaine PH sur cette interaction ne serait pas du à une dimérisation d'EFA6 mais plutôt à un repli intramoléculaire au sein de cette protéine. Nous avons ensuite mis en évidence une interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6. Nous avons pu limiter la zone d'interaction sur le domaine C-terminal et identifier la région riche ProN-CC comme étant impliquée dans l'interaction avec le domaine PH.

EFA6 oscillerait entre au moins deux conformations: une forme où le domaine ProN-CC du Cter viendrait se replier sur le domaine PH et une forme ouverte où les sites d'interaction pour les partenaires du domaine C-terminal seraient démasqués (Figure 52). Ce mécanisme de régulation par un repli intramoléculaire a déjà été décrit pour ARNO, un autre facteur d'échange pour les Arfs. D'une part des études ont mis en évidence que le domaine Coiled-Coil en Nterminal venait se replier sur le domaine PH empêchant ainsi son interaction avec les membranes. D'autres part il a été décrit que le domaine polybasique en C-terminal venait se replier sur le domaine intermédiaire entre le domaine Sec7 et le domaine PH. Ce repli

147

joue le rôle de pseudo-substrat qui bloque ARNO dans une conformation inactive. Parmi les facteurs qui permettent l'ouverture de la protéine ARNO on retrouve la petite protéine G Arf6 sous sa forme GTP. Par analogie nous avons donc cherché à déterminer si Arf6 permettait l'ouverture du facteur d'échange EFA6. Ainsi nous avons pu mettre en évidence une interaction directe entre le domaine C-terminal d'EFA6 et Arf6. Nous avons observé que cette interaction se faisait préférentiellement avec la forme GDP d'Arf6 et avons identifié le domaine ProN du C-terminal comme étant le domaine nécessaire à cette interaction. De manière surprenante nous avons mis en évidence une interaction entre EFA6 et son substrat par un domaine différent que le domaine catalytique. Arf6 ne semble pas être un facteur permettant l'ouverture d'EFA6. En effet bien qu'Arf6-GDP et Arf6-GTP semblent interagir sous certaines conditions avec la construction PH-C-terminale, cette interaction reste relativement faible. Ces observations peuvent être dues à la dynamique de la protéine EFA6. En effet nous pouvons penser que l'interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6 n'est pas statique et que la protéine va osciller entre un état fermé et un état ouvert permettant une probabilité de rencontre entre le domaine C-terminal et Arf6. De plus nous avons pu observer que le domaine PH et Arf6 partageaient partiellement le même site d'interaction sur le domaine C-terminal (respectivement domaine ProN-CC et ProN). Ces résultats laissent imaginer qu'une fois lié, Arf6-GDP pourrait empêcher l'interaction entre les domaines PH et C-terminal et ainsi maintenir EFA6 dans une conformation ouverte.

Nous avons pu également observer une interaction entre la construction PH-C-terminal et Arf6 dans des conditions en présence de vésicules. Néanmoins, les lipides ne semblent pas être un facteur suffisant pour permettre l'ouverture d'EFA6. Bien que les expériences sur la cinétique d'échange nucléotidique d'Arf6 aient été réalisées en présence de liposomes nous n'avons pas observé un effet du PH-C-terminal similaire à celui du domaine C-terminal.

Dans la dernière partie de cette étude nous avons mis en évidence un effet surprenant du domaine C-terminal. Nous avons observé que ce dernier semble avoir un effet inhibiteur sur l'échange nucléotidique d'Arf6 spontané ou catalysé par EFA6. Alors que la vitesse initiale semble être constante, nous remarquons que le domaine C-terminal agit sur le plateau atteint. Le plateau correspond à la quantité maximale d'Arf6 capable de lier le GTPγS. Ces résultats suggèrent que le domaine C-terminal ne ralentit pas la vitesse d'échange mais agit plutôt sur la quantité d'Arf6 capable d'être activée. Nos résultats semblent indiquer que le

domaine C-terminal en interagissant avec Arf6-GDP va piéger cette dernière et empêcher son activation. Néanmoins le rôle de cette interaction entre le domaine C-terminal et Arf6-GDP reste à déterminer.

On peut donc imaginer plusieurs hypothèses. Le domaine C-terminal d'EFA6 pourrait séquestrer un pool d'Arf6-GDP afin de le rendre immédiatement disponible pour être activé par le domaine Sec7 dans des conditions précises et en réponse à divers stimuli. Le domaine C-terminal d'EFA6 pourrait également être à l'origine d'une deuxième voie de signalisation dépendante d'Arf6-GDP et indépendante de l'activité catalytique du domaine Sec7. Cet Arf6-GDP piégé par le domaine C-terminal pourrait interagir avec ses propres effecteurs et les recruter dans des conditions précises afin de contrôler d'autres voies de signalisation. Nous retrouvons notamment parmi les effecteurs d'Arf6-GDP FE65, une protéine adaptatrice enrichie dans le cerveau et interagissant avec la protéine APP (Amyloid Precursor Protein). Il a été montré que cette interaction est impliquée dans la croissante des neurites



#### Figure 52: Modèle du mécanisme de régulation du facteur d'échange EFA6

Le facteur d'échange EFA6 oscille entre un état où le domaine C-terminal est replié sur le domaine PH et un état ouvert permettant son interaction avec différents partenaires.

# Discussion

## Discussion

Dans la première partie de ce manuscrit nous avons identifié et caractérisé une interaction entre le facteur d'échange EFA6 et l'endophiline. Nous avons également proposé un modèle rendant compte du rôle de ces deux protéines dans l'endocytose dépendante de la clathrine. Néanmoins, de nombreuses zones d'ombres demeurent, notamment les mécanismes de régulation de cette interaction.

#### 1. Mécanismes de régulation de l'interaction entre EFA6 et l'endophiline

De façon surprenante nous avons constaté que cette interaction dépend du degré de courbure de la membrane lipidique. Cependant, même sur une surface membranaire plane, cette interaction n'est probablement pas constitutive et d'autres facteurs doivent réguler cette interaction. L'identification des signaux et mécanismes moléculaires qui régulent spatio-temporellement la formation du complexe EFA6/endophiline nous permettrait de mieux comprendre sa fonction. Nous pourrions aussi déterminer par cristallographie la structure du complexe formé par EFA6 et l'endophiline, et déterminer les acides aminés impliqués dans l'interaction. Ceci permettrait d'obtenir des mutants des deux protéines incapables d'interagir et d'étudier cette perte d'interaction sur leurs différentes fonctions et sur le traffic membranaire en général. Des études ont également permis d'identifier au sein du domaine N-BAR plusieurs sites de phosphorylation qui contrôlent la liaison de l'endophiline aux membranes et la fonction de cette dernière dans l'endocytose. Il serait intéressant d'étudier l'effet de ces phosphorylations sur l'interaction entre l'endophiline et EFA6.

## <u>Caractérisation de l'effet stimulateur de l'endophiline sur l'activité catalytique</u> d'EFA6

Nous avons également identifié l'endophiline comme étant le premier stimulateur de l'activité catalytique d'EFA6 par interaction directe avec le domaine Sec7. Une analyse structurale permettrait la détermination précise du site d'interaction ainsi que du mécanisme par lequel l'endophiline stimule l'activité catalytique d'EFA6. Nous pouvons imaginer que l'endophiline module la structure 3D du domaine Sec7 ou l'organisation

structurale de la protéine augmentant ainsi l'affinité d'EFA6 pour son substrat Arf6, mais cette hypothèse reste à être démontrée.

#### 3. <u>Rôle de cette interaction dans l'endocytose dépendante de la clathrine</u>

La fonction de cette fraction d'Arf6 activée localement par le complexe EFA6/endophiline reste inconnue. En revanche, nous savons qu'une forte concentration d'Arf6-GTP permet l'activation de la PIP5K (Aikawa and Martin, 2003), et donc la production de PIP2, et le recrutement de la protéine AP-2 (Paleotti et al., 2005). Ainsi, une forte concentration d'Arf6-GTP pourrait permettre le recrutement de la machinerie d'endocytose et conduire à la formation des puits d'endocytose recouverts de clathrine. La technique du TIR-FM devrait nous permettre dans un premier temps de confirmer que le marquage ponctiforme de l'endophiline est dû à sa présence dans les puits recouverts de clathrine. Pour cela nous pourrions comparer sa localisation avec celle de la clathrine. Par cette technique nous pourrions également étudier l'effet de mutants incapables d'interagir ou du mutant constitutivement inactif d'EFA6, EFA6<sub>E242K</sub>, sur la cinétique d'apparition dans les puits, mais également sur la formation des puits et l'assemblage du manteau de clathrine, sur l'endocytose et le recyclage.

Dans la seconde partie nous avons pu observer que le facteur d'échange EFA6 semble osciller entre au moins deux conformations, une ouverte et une repliée par une interaction entre les domaines PH et C-terminal. Néanmoins plusieurs questions concernant le rôle et les mécanismes moléculaires régulant cette interaction restent en suspens.

#### 4. Régulation de l'ouverture par des partenaires d'EFA6

Il nous reste tout d'abord à identifier les facteurs régulant les mécanismes d'ouverture d'EFA6. Nous avons donc cherché parmi les interacteurs déjà connus du domaine C-terminal, des protéines capables d'intervenir dans ce mécanisme d'ouverture. Nous savons d'ores et déjà que la β-arrestine et Arf6-GDP ne sont pas capables de favoriser le passage d'EFA6 sous une conformation ouverte. Nos expériences nous ont montré que ces deux protéines n'interagissaient pas ou peu avec le domaine PH-C-terminal qui sous sa conformation fermée masque les sites d'interaction présents sur le domaine C-terminal.

J'ai pu également m'intéresser au rôle de l' $\alpha$ -actinine sur le mécanisme d'ouverture de la protéine EFA6. L' $\alpha$ -actinine est une protéine impliquée dans le branchement des filaments d'actine. Une étude a mis en évidence qu'elle était capable d'interagir avec le domaine Cterminal d'EFA6 (Sakagami et al., 2007). Nous nous sommes basés sur l'hypothèse selon laquelle le domaine PH-C-terminal ouvert posséderait les mêmes propriétés sur l'échange nucléotidique d'Arf6 que le domaine C-terminal. Ainsi, une protéine favorisant l'ouverture permettrait au domaine PH-C-terminal d'inhiber l'activation d'Arf6. J'ai donc réalisé des expériences préliminaires sur la cinétique d'échange nucléotidique spontané d'Arf6 en GTPyS en présence du PH-Cter et de l' $\alpha$ -actinine seuls ou ensemble. Dans ces expériences nous nous sommes plus particulièrement intéressés au t<sub>1/2</sub>, qui correspond au temps nécessaire pour obtenir la moitié de la liaison maximale d'Arf6 au GTPyS. Ainsi nous avons pu constater qu'Arf6 atteint la moitié de sa liaison maximale en 10,4min en moyenne quand elle est incubée seule et que ce temps passe à 9,7min en présence du domaine PH-C-terminal. Ces résultats confirment l'absence d'effet significatif du domaine PH-C-terminal sur la liaison d'Arf6 au GTP $\gamma$ S. En contrôle, nous observons que la présence de l' $\alpha$ -actinine n'influençait que très peu le  $t_{1/2}$  d'Arf6 suggérant que l' $\alpha$ -actinine n'a pas d'effet sur l'échange nucléotidique d'Arf6. Lorsqu'Arf6 est incubée avec le domaine PH-C-terminal et l' $\alpha$ -actinine on constate que le t<sub>1/2</sub> est augmenté. En effet, il passe de 9,7min (PH-C-terminal seul) à 16min (PH-C-terminal+ $\alpha$ -actinine) (Figure 53). Ces résultats suggèrent que l' $\alpha$ -actinine permet l'ouverture de ce repli intramoléculaire et de dévoiler l'effet inhibiteur du domaine Cterminal. Cette étude demeure toutefois préliminaire et doit donc être confirmée et approfondie.

Il serait également intéressant de déterminer le site d'interaction sur le domaine C-terminal d'EFA6 pour l'α-actinine. Ceci nous permettrait par une approche de mutagénèse d'obtenir des constructions constutivement ouvertes ou fermées et ainsi tester les répercussions sur les différents processus physiologiques auxquels EFA6 participe.

Des études ont mis en évidence qu'EFA6 est impliqué dans la réorganisation du cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de son domaine C-terminal. En effet, EFA6 est capable d'interagir directement avec l'actine filamenteuse (Macia et al., 2008) et, de manière similaire à l'actinine, il serait intéressant de tester l'effet de cette dernière sur le mécanisme d'ouverture d'EFA6.

155

#### 5. <u>Régulation de l'ouverture par des modifications post-traductionnelles</u>

Des études menées au laboratoire ont également mis en évidence que l'addition de sérum dans le milieu de cellules surexprimant EFA6 conduisait à l'activation d'Arf6 et à la redistribution du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique dans des compartiments intracellulaires (Macia et al., 2012). Ceci est le premier stimulus à avoir été décrit comme induisant l'activation d'Arf6 par EFA6. De plus l'ajout de sérum dans le milieu ne semble pas modifier la localisation cellulaire d'EFA6. Ces résultats mettent en évidence que le sérum ne régule l'activité d'EFA6 en contrôlant sa localisation et son recrutement à un endroit précis de la cellule. Ceci suggère qu'un changement de conformation au sein de la protéine est à l'origine de cette activité d'échange. Nous pouvons donc supposer que le sérum active certaines voies de signalisation aboutissant à des modifications post-traductionnelles d'EFA6.

Nous savons également que l'expression et l'activité des protéines peuvent être régulées par des modifications post-traductionnelles.

Ainsi une étude réalisée au sein de l'équipe a mis en évidence que le niveau d'expression d'EFA6 était maintenu bas par une ubiquitination et une dégradation constitutive par le protéasome et que son expression était augmentée avant la formation des jonctions serrées par l'action de la déubiquitinase USP9x (Theard et al., 2010). En plus de son rôle dans la dégradation des protéines, l'ubiquitination participe aussi à la régulation de leurs activités. Par ailleurs la caractérisation de l'interaction entre USP9x et EFA6 a permis d'identifier le domaine PH d'EFA6 comme nécessaire et suffisant à la liaison d'USP9x. L'identification des site d'ubiquitination au sein de la protéine EFA6 et une étude plus approfondie de cette voie nous permettrait de compléter nos résultats sur le mécanisme de régulation d'EFA6.

Dans la même optique nous pourrions également nous intéresser au mecanisme de sumoylation de la protéine EFA6. L'addition de groupements SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sur une protéine affecte sa localisation, son activité et l'interaction avec ses partenaires. Une étude de la séquence d'EFA6 a permis d'identifier deux sites de sumoylation potentiels au sein de la protéine. Il serait donc intéressant de valider ces résultats et par la suite d'étudier le rôle de la sumoylation sur la régulation d'EFA6. Pour cela nous pourrions réaliser une expérience de pull down avec la protéine EFA6 sumoyler afin d'analyser l'interaction d'EFA6 avec ces différents partenaires.

156

Par analogie avec le facteur d'échange ARNO dont le mécanisme de régulation implique plusieurs phosphorylations (Hiester and Santy, 2013), nous pourrions déterminer l'ensemble des acides aminés susceptibles d'être phosphorylés au sein du sous-domaine ProN de la région C-terminale et du domaine PH d'EFA6. De plus nous savons que la phosphorylation de la sérine 392 d'ARNO par la PKC permet l'ouverture du domaine polybasique et ce résidu se trouve conservé dans la protéine EFA6. Par une approche de mutagenèse mimant une phosphorylation de ces résidus, associée à une approche biochimique, nous pourrions déterminer si la régulation d'EFA6 se fait par ce mécanisme et dans l'affirmative les résidus impliqués.

#### 6. Caractérisation de l'interaction entre le domaine C-terminal et Arf6-GDP

En plus du mécanisme de régulation du facteur d'échange EFA6, il serait essentiel d'étudier plus précisément l'interaction entre le domaine C-terminal d'EFA6 et la petite protéine G Arf6. D'une part, le domaine C-terminal possède-t'il un effet inhibiteur sur l'échange catalysé par EFA6 ? Afin de répondre à cette question nous pourrions tester l'activité catalytique de différents mutants d'EFA6 sur l'échange nucléotidique de la protéine Arf6. En effet, en comparant l'activité catalytique d'EFA6 et d'un mutant ne possédant pas le domaine Cterminal (EFA6ΔC) sur l'échange nucléotidique d'Arf6, nous pourrions voir si le domaine Cterminal endogène possède un effet inhibiteur. Dans l'affirmative, ces résultats indiqueraient que le domaine C-terminal endogène piège une quantité d'Arf6 la rendant inactivable. Nous pourrions également réaliser une construction dépourvu du domaine PH mais capable de lier les membranes, par ajout d'une ancre lipidique par exemple. Nous pourrions par la suite étudier l'effet du C-terminal sur l'échange catalysé par cette construction.

D'autre part quel est le rôle fonctionnel de cette interaction? En effet, nous avons pu constater que le domaine C-terminal d'EFA6 est capable en séquestrant de l'Arf6-GDP d'empêcher son activation. Néanmoins le devenir de cet Arf6 et sa fonction restent inconnus. Nous savons également que la quantité de facteur d'échange est limitante par rapport à la quantité de protéine Arf6. De ce fait, nous pouvons supposer que la quantité d'Arf6 séquestrée par le domaine C-terminal reste relativement faible au sein de la cellule. Nous pouvons également imaginer que dans des conditions spatio-temporelles définies, une concentration locale d'EFA6 permettrait par l'intermédiaire de son extrémité C-terminal de

recruter un pool d'Arf6-GDP qui par l'intermédiaire de différents effecteurs va signaler dans la cellule. Ainsi des expériences complémentaires doivent être réalisées dans le but de répondre à cette question.



#### Figure 53: Le domaine PH-C-terminal d'EFA6 est capable d'inhiber l'échange GDP/GTP spontané d'Arf6-GDP en présence d'α-actinine

Cinétique de liaison spontanée d'Arf6 non myristylé (1,4 $\mu$ M) au GTP $\gamma$ S[<sup>35</sup>S] seul ou en présence du domaine PH-Cter (750nM) et de l' $\alpha$ -actinine (0,5 $\mu$ M) seul ou ensemble. Les expériences sont réalisées en présence d'azolectine et la quantité d'Arf6 liée au GTP $\gamma$ S est déterminée pour chaque temps par filtration sur membrane de nitrocellulose. Le t<sub>1/2</sub> correspondant au temps nécessaire pour qu'Arf6 atteigne la moitié de sa liaison maximale est ensuite déterminé par une équation de cinétique d'ordre 1.

**Conclusion générale** 

# **Conclusion générale**

En résumé, ce travail de thèse nous a permis d'identifier différents mécanismes régulant l'interaction d'EFA6 avec ses différents partenaires. En effet, nous avons pu mettre en évidence une interaction directe entre le domaine N-BAR de l'endophiline et le domaine Sec7 d'EFA6. De plus, nous avons pu observer que la courbure membranaire était un facteur qui régulait l'interaction entre ces deux partenaires. EFA6 est capable d'interagir et de recruter l'endophiline sur une membrane plane et on observe en présence de vésicules courbées une dissociation de l'endophiline et d'EFA6. Par ailleurs nous avons mis en évidence que l'endophiline semble stimuler l'activité d'échange d'EFA6 sur la petite protéine G Arf6. Dans un second temps nous avons pu mettre en évidence dans l'étude menée en collaboration avec l'équipe du Dr Cherfils, que l'activité catalytique d'EFA6 était régulée par une boucle de rétrocontrôle négatif exercée spécifiquement par la protéine Arf6-GTP. Nous observons en présence de la protéine Arf6-GTP une diminution de l'activité d'échange d'EFA6 et avons mis en évidence que cet effet était dû à une interaction entre Arf6-GTP et le domaine PH-C-terminal d'EFA6. Pour finir nous avons mis en évidence une interaction entre le domaine C-terminal et le domaine PH d'EFA6 qui contrôle son interaction avec différents partenaires dont la β-arrestine et avons observé une interaction entre le domaine C-terminal et la protéine Arf6-GDP qui semble contrôler l'activation de cette dernière. Néanmoins plusieurs questions restent en suspens, notamment celles concernant les mécanismes qui vont permettre l'ouverture de ce repli intra-moléculaire.

# Références

# Références

Ahmed, S., Goh, W.I., and Bu, W. (2010). I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. Semin Cell Dev Biol *21*, 350-356.

Aikawa, Y., and Martin, T.F. (2003). ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. J Cell Biol *162*, 647-659.

Ait-Slimane, T., Galmes, R., Trugnan, G., and Maurice, M. (2009). Basolateral internalization of GPIanchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells. Mol Biol Cell *20*, 3792-3800.

Altschuler, Y., Liu, S., Katz, L., Tang, K., Hardy, S., Brodsky, F., Apodaca, G., and Mostov, K. (1999). ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. J Cell Biol *147*, 7-12.

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.

Ardissone, A., Bragato, C., Caffi, L., Blasevich, F., Maestrini, S., Bianchi, M.L., Morandi, L., Moroni, I., and Mora, M. (2013). Novel PTRF mutation in a child with mild myopathy and very mild congenital lipodystrophy. BMC Med Genet *14*, 89.

Baldassarre, T., Watt, K., Truesdell, P., Meens, J., Schneider, M.M., Sengupta, S.K., and Craig, A.W. (2015). Endophilin A2 Promotes TNBC Cell Invasion and Tumor Metastasis. Mol Cancer Res *13*, 1044-1055.

Beemiller, P., Zhang, Y., Mohan, S., Levinsohn, E., Gaeta, I., Hoppe, A.D., and Swanson, J.A. (2010). A Cdc42 activation cycle coordinated by PI 3-kinase during Fc receptor-mediated phagocytosis. Mol Biol Cell *21*, 470-480.

Begle, A., Tryoen-Toth, P., de Barry, J., Bader, M.F., and Vitale, N. (2009). ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. J Biol Chem 284, 4836-4845.

Belmonte, S.L., and Blaxall, B.C. (2011). G protein coupled receptor kinases as therapeutic targets in cardiovascular disease. Circ Res *109*, 309-319.

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.

Bist, A., Fielding, P.E., and Fielding, C.J. (1997). Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 10693-10698.

Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. Nat Cell Biol 1, 298-304.

Bonifacino, J.S. (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 23-32.

Bonifacino, J.S., and Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. Cell 116, 153-166.

Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. Cell *129*, 865-877.

Boucrot, E., Ferreira, A.P., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N., and McMahon, H.T. (2015). Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. Nature *517*, 460-465.

Boulakirba, S., Macia, E., Partisani, M., Lacas-Gervais, S., Brau, F., Luton, F., and Franco, M. (2014). Arf6 exchange factor EFA6 and endophilin directly interact at the plasma membrane to control clathrin-mediated endocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, 9473-9478.

Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature *349*, 117-127.

Breda, C., Nugent, M.L., Estranero, J.G., Kyriacou, C.P., Outeiro, T.F., Steinert, J.R., and Giorgini, F. Rab11 modulates alpha-synuclein-mediated defects in synaptic transmission and behaviour. Hum Mol Genet *24*, 1077-1091.

Brown, F.D., Rozelle, A.L., Yin, H.L., Balla, T., and Donaldson, J.G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. J Cell Biol *154*, 1007-1017.

Cao, M., Milosevic, I., Giovedi, S., and De Camilli, P. (2014). Upregulation of Parkin in endophilin mutant mice. J Neurosci *34*, 16544-16549.

Carman, C.V., Parent, J.L., Day, P.W., Pronin, A.N., Sternweis, P.M., Wedegaertner, P.B., Gilman, A.G., Benovic, J.L., and Kozasa, T. (1999). Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. J Biol Chem *274*, 34483-34492.

Casanova, J.E. (2007). Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. Traffic *8*, 1476-1485.

Caumont, A.S., Galas, M.C., Vitale, N., Aunis, D., and Bader, M.F. (1998). Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. J Biol Chem *273*, 1373-1379.

Chadda, R., Howes, M.T., Plowman, S.J., Hancock, J.F., Parton, R.G., and Mayor, S. (2007). Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. Traffic *8*, 702-717.

Chang-Ileto, B., Frere, S.G., Chan, R.B., Voronov, S.V., Roux, A., and Di Paolo, G. (2011). Synaptojanin 1-mediated PI(4,5)P2 hydrolysis is modulated by membrane curvature and facilitates membrane fission. Dev Cell *20*, 206-218.

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., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1991). Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. Nature *353*, 769-772.

Chavrier, P., and Goud, B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. Curr Opin Cell Biol *11*, 466-475.

Chen, P.W., Jian, X., Yoon, H.Y., and Randazzo, P.A. (2013). ARAP2 signals through Arf6 and Rac1 to control focal adhesion morphology. J Biol Chem *288*, 5849-5860.

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.

Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. Physiol Rev *93*, 269-309.

Claing, A., Chen, W., Miller, W.E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2- adrenergic receptor endocytosis. J Biol Chem *276*, 42509-42513.

Cohen, A.W., Hnasko, R., Schubert, W., and Lisanti, M.P. (2004). Role of caveolae and caveolins in health and disease. Physiol Rev *84*, 1341-1379.

Cohen, A.W., Razani, B., Wang, X.B., Combs, T.P., Williams, T.M., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (2003). Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. Am J Physiol Cell Physiol *285*, C222-235.

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.

Collins, B.M., McCoy, A.J., Kent, H.M., Evans, P.R., and Owen, D.J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. Cell *109*, 523-535.

Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Luthi, A., Kim, W.T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S.B., Flavell, R.A., *et al.* (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. Cell *99*, 179-188.

D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D., and Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. Embo J *16*, 5445-5454.

D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol *7*, 347-358.

Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E., and Schmid, S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. J Cell Biol *127*, 915-934.

David, C., McPherson, P.S., Mundigl, O., and de Camilli, P. (1996). A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 331-335.

David, C., Solimena, M., and De Camilli, P. (1994). Autoimmunity in stiff-Man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins, Rvs167 and Rvs161. FEBS Lett *351*, 73-79.

de Heuvel, E., Bell, A.W., Ramjaun, A.R., Wong, K., Sossin, W.S., and McPherson, P.S. (1997). Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. J Biol Chem *272*, 8710-8716.

Decressac, S., Franco, M., Bendahhou, S., Warth, R., Knauer, S., Barhanin, J., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2004). ARF6-dependent interaction of the TWIK1 K(+) channel with EFA6, a GDP/GTP exchange factor for ARF6. EMBO Rep *5*, 1171-1175.

Derrien, V., Couillault, C., Franco, M., Martineau, S., Montcourrier, P., Houlgatte, R., and Chavrier, P. (2002). A conserved C-terminal domain of EFA6-family ARF6-guanine nucleotide exchange factors induces lengthening of microvilli-like membrane protrusions. J Cell Sci *115*, 2867-2879.

Dhami, G.K., Anborgh, P.H., Dale, L.B., Sterne-Marr, R., and Ferguson, S.S. (2002). Phosphorylationindependent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2. J Biol Chem *277*, 25266-25272.

DiNitto, J.P., Delprato, A., Gabe Lee, M.T., Cronin, T.C., Huang, S., Guilherme, A., Czech, M.P., and Lambright, D.G. (2007). Structural basis and mechanism of autoregulation in 3-phosphoinositide-dependent Grp1 family Arf GTPase exchange factors. Mol Cell *28*, 569-583.

Dubois, T., Paleotti, O., Mironov, A.A., Fraisier, 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.

Dunphy, J.L., Moravec, R., Ly, K., Lasell, T.K., Melancon, P., and Casanova, J.E. (2006). The Arf6 GEF GEP100/BRAG2 regulates cell adhesion by controlling endocytosis of beta1 integrins. Curr Biol *16*, 315-320.

Eades, G., Wolfson, B., Zhang, Y., Li, Q., Yao, Y., and Zhou, Q. (2015). lincRNA-RoR and miR-145 regulate invasion in triple-negative breast cancer via targeting ARF6. Mol Cancer Res *13*, 330-338.

Echarri, A., and Del Pozo, M.A. (2015). Caveolae - mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments. J Cell Sci *128*, 2747-2758.

Eva, R., Crisp, S., Marland, J.R., Norman, J.C., Kanamarlapudi, V., ffrench-Constant, C., and Fawcett, J.W. (2012). ARF6 directs axon transport and traffic of integrins and regulates axon growth in adult DRG neurons. J Neurosci *32*, 10352-10364.

Ferguson, S.M., Brasnjo, G., Hayashi, M., Wolfel, M., Collesi, C., Giovedi, S., Raimondi, A., Gong, L.W., Ariel, P., Paradise, S., *et al.* (2007). A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. Science *316*, 570-574.

Fielding, C.J., Bist, A., and Fielding, P.E. (1997). Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 3753-3758.

Flannagan, R.S., Jaumouille, V., and Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. Annu Rev Pathol 7, 61-98.
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. (1993). Myristoylation is not required for GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor ARF1 to phospholipids. J Biol Chem *268*, 24531-24534.

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.

Franco, M., Chardin, P., Chabre, M., and Paris, S. (1996). Myristoylation-facilitated binding of the G protein ARF1GDP to membrane phospholipids is required for its activation by a soluble nucleotide exchange factor. J Biol Chem *271*, 1573-1578.

Franco, M., Peters, P.J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (1999). EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. Embo J *18*, 1480-1491.

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.

Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., and Schioth, H.B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Mol Pharmacol *63*, 1256-1272.

Frost, A., Unger, V.M., and De Camilli, P. (2009). The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules. Cell *137*, 191-196.

Gad, H., Ringstad, N., Low, P., Kjaerulff, O., Gustafsson, J., Wenk, M., Di Paolo, G., Nemoto, Y., Crun, J., Ellisman, M.H., *et al.* (2000). Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. Neuron *27*, 301-312.

Gallop, J.L., Jao, C.C., Kent, H.M., Butler, P.J., Evans, P.R., Langen, R., and McMahon, H.T. (2006). Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. EMBO J *25*, 2898-2910.

Garcia-Higuera, I., Penela, P., Murga, C., Egea, G., Bonay, P., Benovic, J.L., and Mayor, F., Jr. (1994). Association of the regulatory beta-adrenergic receptor kinase with rat liver microsomal membranes. J Biol Chem *269*, 1348-1355.

Garg, A., and Agarwal, A.K. (2008). Caveolin-1: a new locus for human lipodystrophy. J Clin Endocrinol Metab *93*, 1183-1185.

Goldberg, J. (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. Cell *95*, 237-248.

Gortat, A., San-Roman, M.J., Vannier, C., and Schmidt, A.A. (2012). Single point mutation in Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) sequence of endophilin impairs dimerization, membrane shaping, and Src homology 3 domain-mediated partnership. J Biol Chem *287*, 4232-4247.

Grande-Garcia, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N.B., Waterman-Storer, C.M., Valdivielso, J.M., and del Pozo, M.A. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. J Cell Biol *177*, 683-694.

Grassart, A., Dujeancourt, A., Lazarow, P.B., Dautry-Varsat, A., and Sauvonnet, N. (2008). Clathrinindependent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. EMBO Rep *9*, 356-362.

Grossmann, A.H., Yoo, J.H., Clancy, J., Sorensen, L.K., Sedgwick, A., Tong, Z., Ostanin, K., Rogers, A., Grossmann, K.F., Tripp, S.R., *et al.* (2013). The small GTPase ARF6 stimulates beta-catenin transcriptional activity during WNT5A-mediated melanoma invasion and metastasis. Sci Signal *6*, ra14.

Gupta, G.D., Swetha, M.G., Kumari, S., Lakshminarayan, R., Dey, G., and Mayor, S. (2009). Analysis of endocytic pathways in Drosophila cells reveals a conserved role for GBF1 in internalization via GEECs. PLoS One *4*, e6768.

Han, M., Gurevich, V.V., Vishnivetskiy, S.A., Sigler, P.B., and Schubert, C. (2001). Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 A: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. Structure (Camb) *9*, 869-880.

Hansen, C.G., Howard, G., and Nichols, B.J. (2011). Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. J Cell Sci *124*, 2777-2785.

Hashimoto, A., Hashimoto, S., Ando, R., Noda, K., Ogawa, E., Kotani, H., Hirose, M., Menju, T., Morishige, M., Manabe, T., *et al.* (2011). GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin pathway frequently used in cancer invasion is activated by VEGFR2 to promote angiogenesis. PLoS One *6*, e23359.

Hayashi, Y.K., Matsuda, C., Ogawa, M., Goto, K., Tominaga, K., Mitsuhashi, S., Park, Y.E., Nonaka, I., Hino-Fukuyo, N., Haginoya, K., *et al.* (2009). Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. J Clin Invest *119*, 2623-2633.

Henne, W.M., Kent, H.M., Ford, M.G., Hegde, B.G., Daumke, O., Butler, P.J., Mittal, R., Langen, R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2007). Structure and analysis of FCHo2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. Structure *15*, 839-852.

Heuser, J.E., Keen, J.H., Amende, L.M., Lippoldt, R.E., and Prasad, K. (1987). Deep-etch visualization of 27S clathrin: a tetrahedral tetramer. J Cell Biol *105*, 1999-2009.

Heuvingh, J., Franco, M., Chavrier, P., and Sykes, C. (2007). ARF1-mediated actin polymerization produces movement of artificial vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 16928-16933.

Hiester, K.G., and Santy, L.C. (2013). The cytohesin coiled-coil domain interacts with threonine 276 to control membrane association. PLoS One *8*, e82084.

Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. J Cell Biol *150*, 1311-1320.

Hiroi, T., Someya, A., Thompson, W., Moss, J., and Vaughan, M. (2006). GEP100/BRAG2: activator of ADP-ribosylation factor 6 for regulation of cell adhesion and actin cytoskeleton via E-cadherin and alpha-catenin. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 10672-10677.

Hofmann, I., Thompson, A., Sanderson, C.M., and Munro, S. (2007). The Arl4 family of small G proteins can recruit the cytohesin Arf6 exchange factors to the plasma membrane. Curr Biol *17*, 711-716.

Hongu, T., Funakoshi, Y., Fukuhara, S., Suzuki, T., Sakimoto, S., Takakura, N., Ema, M., Takahashi, S., Itoh, S., Kato, M., *et al.* (2015). Arf6 regulates tumour angiogenesis and growth through HGF-induced endothelial beta1 integrin recycling. Nat Commun *6*, 7925.

Houndolo, T., Boulay, P.L., and Claing, A. (2005). G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. J Biol Chem *280*, 5598-5604.

Humphreys, D., Davidson, A.C., Hume, P.J., Makin, L.E., and Koronakis, V. (2013). Arf6 coordinates actin assembly through the WAVE complex, a mechanism usurped by Salmonella to invade host cells. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, 16880-16885.

Hunzicker-Dunn, M., Gurevich, V.V., Casanova, J.E., and Mukherjee, S. (2002). ARF6: a newly appreciated player in G protein-coupled receptor desensitization. FEBS Lett *521*, 3-8.

Imoto, M., Tachibana, I., and Urrutia, R. (1998). Identification and functional characterization of a novel human protein highly related to the yeast dynamin-like GTPase Vps1p. J Cell Sci *111 ( Pt 10)*, 1341-1349.

Innocenti, M., Gerboth, S., Rottner, K., Lai, F.P., Hertzog, M., Stradal, T.E., Frittoli, E., Didry, D., Polo, S., Disanza, A., *et al.* (2005). Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. Nat Cell Biol *7*, 969-976.

Itoh, T., and De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. Biochim Biophys Acta *1761*, 897-912.

Jackson, C.L., and Casanova, J.E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. Trends Cell Biol *10*, 60-67.

Jackson, L.P., Kelly, B.T., McCoy, A.J., Gaffry, T., James, L.C., Collins, B.M., Honing, S., Evans, P.R., and Owen, D.J. (2010). A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. Cell *141*, 1220-1229.

Jaffe, A.B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu Rev Cell Dev Biol 21, 247-269.

Johannes, L., and Lamaze, C. (2002). Clathrin-dependent or not: is it still the question? Traffic *3*, 443-451.

Jones, D.H., Morris, J.B., Morgan, C.P., Kondo, H., Irvine, R.F., and Cockcroft, S. (2000). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. J Biol Chem *275*, 13962-13966.

Julian, L., and Olson, M.F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. Small GTPases *5*, e29846.

Kahn, R.A., and Gilman, A.G. (1984). Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. J Biol Chem *259*, 6228-6234.

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.

Kaneko, T., Maeda, A., Takefuji, M., Aoyama, H., Nakayama, M., Kawabata, S., Kawano, Y., Iwamatsu, A., Amano, M., and Kaibuchi, K. (2005). Rho mediates endocytosis of epidermal growth factor receptor through phosphorylation of endophilin A1 by Rho-kinase. Genes Cells *10*, 973-987.

Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. Nat Rev Mol Cell Biol *9*, 517-531.

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.

Keen, J.H. (1990). Clathrin and associated assembly and disassembly proteins. Annu Rev Biochem *59*, 415-438.

Kim, J.H., Lee, S.D., Han, J.M., Lee, T.G., Kim, Y., Park, J.B., Lambeth, J.D., Suh, P.G., and Ryu, S.H. (1998). Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA. FEBS Lett *430*, 231-235.

Kirchhausen, T. (2000). Clathrin. Annu Rev Biochem 69, 699-727.

Kirkham, M., Fujita, A., Chadda, R., Nixon, S.J., Kurzchalia, T.V., Sharma, D.K., Pagano, R.E., Hancock, J.F., Mayor, S., and Parton, R.G. (2005). Ultrastructural identification of uncoated caveolinindependent early endocytic vehicles. J Cell Biol *168*, 465-476.

Kjaerulff, O., Brodin, L., and Jung, A. (2011). The structure and function of endophilin proteins. Cell Biochem Biophys *60*, 137-154.

Klein, S., Franco, M., Chardin, P., and Luton, F. (2006). Role of the Arf6 GDP/GTP cycle and Arf6 GTPase-activating proteins in actin remodeling and intracellular transport. J Biol Chem *281*, 12352-12361.

Klein, S., Partisani, M., Franco, M., and Luton, F. (2008). EFA6 facilitates the assembly of the tight junction by coordinating an Arf6-dependent and -independent pathway. J Biol Chem *283*, 30129-30138.

Koch, W.J., Inglese, J., Stone, W.C., and Lefkowitz, R.J. (1993). The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. J Biol Chem *268*, 8256-8260.

Kohout, T.A., and Lefkowitz, R.J. (2003). Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. Mol Pharmacol *63*, 9-18.

Kon, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Sabe, H., and Satake, M. (2008). Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1. Exp Cell Res *314*, 1415-1428.

Kumari, S., and Mayor, S. (2008). ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. Nat Cell Biol *10*, 30-41.

Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. Mol Cell *7*, 661-671.

Li, J., Edwards, P.C., Burghammer, M., Villa, C., and Schertler, G.F. (2004). Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form. J Mol Biol *343*, 1409-1438.

Li, M., Ng, S.S., Wang, J., Lai, L., Leung, S.Y., Franco, M., Peng, Y., He, M.L., Kung, H.F., and Lin, M.C. (2006). EFA6A enhances glioma cell invasion through ADP ribosylation factor 6/extracellular signal-regulated kinase signaling. Cancer Res *66*, 1583-1590.

Li, X., Sapp, E., Chase, K., Comer-Tierney, L.A., Masso, N., Alexander, J., Reeves, P., Kegel, K.B., Valencia, A., Esteves, M., *et al.* (2009). Disruption of Rab11 activity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. Neurobiol Dis *36*, 374-383.

Liu, L., Brown, D., McKee, M., Lebrasseur, N.K., Yang, D., Albrecht, K.H., Ravid, K., and Pilch, P.F. (2008). Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. Cell Metab *8*, 310-317.

Lo, S.Y., Brett, C.L., Plemel, R.L., Vignali, M., Fields, S., Gonen, T., and Merz, A.J. Intrinsic tethering activity of endosomal Rab proteins. Nat Struct Mol Biol *19*, 40-47.

Loskutov, Y.V., Kozyulina, P.Y., Kozyreva, V.K., Ice, R.J., Jones, B.C., Roston, T.J., Smolkin, M.B., Ivanov, A.V., Wysolmerski, R.B., and Pugacheva, E.N. (2015). NEDD9/Arf6-dependent endocytic trafficking of matrix metalloproteinase 14: a novel mechanism for blocking mesenchymal cell invasion and metastasis of breast cancer. Oncogene *34*, 3662-3675.

Lund, K.A., Opresko, L.K., Starbuck, C., Walsh, B.J., and Wiley, H.S. (1990). Quantitative analysis of the endocytic system involved in hormone-induced receptor internalization. J Biol Chem *265*, 15713-15723.

Lundmark, R., Doherty, G.J., Howes, M.T., Cortese, K., Vallis, Y., Parton, R.G., and McMahon, H.T. (2008). The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. Curr Biol *18*, 1802-1808.

Luthi, A., Di Paolo, G., Cremona, O., Daniell, L., De Camilli, P., and McCormick, D.A. (2001). Synaptojanin 1 contributes to maintaining the stability of GABAergic transmission in primary cultures of cortical neurons. J Neurosci *21*, 9101-9111.

Luton, F., Klein, S., Chauvin, J.P., Le Bivic, A., Bourgoin, S., Franco, M., and Chardin, P. (2004). EFA6, exchange factor for ARF6, regulates the actin cytoskeleton and associated tight junction in response to E-cadherin engagement. Mol Biol Cell *15*, 1134-1145.

Macia, E., Partisani, M., Favard, C., Mortier, E., Zimmermann, P., Carlier, M.F., Gounon, P., Luton, F., and Franco, M. (2008). The pleckstrin homology domain of the Arf6-specific exchange factor EFA6 localizes to the plasma membrane by interacting with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and F-actin. J Biol Chem *283*, 19836-19844.

Macia, E., Partisani, M., Paleotti, O., Luton, F., and Franco, M. (2012). Arf6 negatively controls the rapid recycling of the beta2 adrenergic receptor. J Cell Sci *125*, 4026-4035.

MacLeod, D.A., Rhinn, H., Kuwahara, T., Zolin, A., Di Paolo, G., McCabe, B.D., Marder, K.S., Honig, L.S., Clark, L.N., Small, S.A., *et al.* RAB7L1 interacts with LRRK2 to modify intraneuronal protein sorting and Parkinson's disease risk. Neuron *77*, 425-439.

Malaby, A.W., van den Berg, B., and Lambright, D.G. (2013). Structural basis for membrane recruitment and allosteric activation of cytohesin family Arf GTPase exchange factors. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, 14213-14218.

Matta, S., Van Kolen, K., da Cunha, R., van den Bogaart, G., Mandemakers, W., Miskiewicz, K., De Bock, P.J., Morais, V.A., Vilain, S., Haddad, D., *et al.* (2012). LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. Neuron *75*, 1008-1021.

Mattera, R., Boehm, M., Chaudhuri, R., Prabhu, Y., and Bonifacino, J.S. (2011). Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. J Biol Chem 286, 2022-2030.

Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 603-612.

McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol *12*, 517-533.

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

McPherson, P.S., Garcia, E.P., Slepnev, V.I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W.S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y., and De Camilli, P. (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. Nature *379*, 353-357.

Meinecke, M., Boucrot, E., Camdere, G., Hon, W.C., Mittal, R., and McMahon, H.T. (2013). Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. J Biol Chem *288*, 6651-6661.

Menetrey, J., Macia, E., Pasqualato, S., Franco, M., and Cherfils, J. (2000). Structure of Arf6-GDP suggests a basis for guanine nucleotide exchange factors specificity. Nat Struct Biol *7*, 466-469.

Micheva, K.D., Kay, B.K., and McPherson, P.S. (1997). Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. J Biol Chem 272, 27239-27245.

Milosevic, I., Giovedi, S., Lou, X., Raimondi, A., Collesi, C., Shen, H., Paradise, S., O'Toole, E., Ferguson, S., Cremona, O., *et al.* (2011). Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. Neuron *72*, 587-601.

Montagnac, G., de Forges, H., Smythe, E., Gueudry, C., Romao, M., Salamero, J., and Chavrier, P. (2011). Decoupling of activation and effector binding underlies ARF6 priming of fast endocytic recycling. Curr Biol *21*, 574-579.

Montagnac, G., Sibarita, J.B., Loubery, S., Daviet, L., Romao, M., Raposo, G., and Chavrier, P. (2009). ARF6 Interacts with JIP4 to control a motor switch mechanism regulating endosome traffic in cytokinesis. Curr Biol *19*, 184-195.

Moore, C.A., Milano, S.K., and Benovic, J.L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. Annu Rev Physiol *69*, 451-482.

Morlot, S., and Roux, A. (2013). Mechanics of dynamin-mediated membrane fission. Annu Rev Biophys *42*, 629-649.

Mossessova, E., Gulbis, J.M., and Goldberg, J. (1998). Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human arno and analysis of the interaction with ARF GTPase. Cell *92*, 415-423.

Mueller, S.C., and Branton, D. (1984). Identification of coated vesicles in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol *98*, 341-346.

Muhlberg, A.B., Warnock, D.E., and Schmid, S.L. (1997). Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. EMBO J *16*, 6676-6683.

Murga, C., Ruiz-Gomez, A., Garcia-Higuera, I., Kim, C.M., Benovic, J.L., and Mayor, F., Jr. (1996). High affinity binding of beta-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation. J Biol Chem *271*, 985-994.

Nakamura, M., and Shimosaki, S. (2009). The ubiquitin-like protein monoclonal nonspecific suppressor factor beta conjugates to endophilin II and regulates phagocytosis. FEBS J *276*, 6355-6363.

Naslavsky, N., Weigert, R., and Donaldson, J.G. (2003). Convergence of non-clathrin- and clathrinderived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. Mol Biol Cell *14*, 417-431.

Nassoy, P., and Lamaze, C. (2012). Stressing caveolae new role in cell mechanics. Trends Cell Biol 22, 381-389.

Nathke, I.S., Heuser, J., Lupas, A., Stock, J., Turck, C.W., and Brodsky, F.M. (1992). Folding and trimerization of clathrin subunits at the triskelion hub. Cell *68*, 899-910.

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.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. J Biol Chem *273*, 5419-5422.

Owen, D.J., Vallis, Y., Noble, M.E., Hunter, J.B., Dafforn, T.R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (1999). A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. Cell *97*, 805-815.

Palacios, F., Schweitzer, J.K., Boshans, R.L., and D'Souza-Schorey, C. (2002). ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. Nat Cell Biol *4*, 929-936.

Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. J Histochem Cytochem 1, 188-211.

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.

Parton, R.G., and del Pozo, M.A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. Nat Rev Mol Cell Biol 14, 98-112.

Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. Nat Rev Mol Cell Biol 8, 185-194.

Payne, C.K., Jones, S.A., Chen, C., and Zhuang, X. (2007). Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. Traffic *8*, 389-401.

Pearse, B.M. (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A *73*, 1255-1259.

Perera, R.M., Zoncu, R., Lucast, L., De Camilli, P., and Toomre, D. (2006). Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 19332-19337.

Perry, M.M., and Gilbert, A.B. (1979). Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (Gallus domesticus): lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. J Cell Sci *39*, 257-272.

Pertz, O. Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? J Cell Sci 123, 1841-1850.

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.

Pitcher, J., Lohse, M.J., Codina, J., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1992). Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. Biochemistry *31*, 3193-3197.

Poupart, M.E., Fessart, D., Cotton, M., Laporte, S.A., and Claing, A. (2007). ARF6 regulates angiotensin II type 1 receptor endocytosis by controlling the recruitment of AP-2 and clathrin. Cell Signal *19*, 2370-2378.

Powelka, A.M., Sun, J., Li, J., Gao, M., Shaw, L.M., Sonnenberg, A., and Hsu, V.W. (2004). Stimulationdependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. Traffic *5*, 20-36.

Qualmann, B., Koch, D., and Kessels, M.M. (2011). Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. EMBO J *30*, 3501-3515.

Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z., and Donaldson, J.G. (1999). ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. J Cell Sci *112*, 855-866.

Radhakrishna, H., and Donaldson, J.G. (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. J Cell Biol *139*, 49-61.

Reiner, C., and Nathanson, N.M. (2008). The internalization of the M2 and M4 muscarinic acetylcholine receptors involves distinct subsets of small G-proteins. Life Sci *82*, 718-727.

Reiter, E., and Lefkowitz, R.J. (2006). GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. Trends Endocrinol Metab *17*, 159-165.

Renard, H.F., Simunovic, M., Lemiere, J., Boucrot, E., Garcia-Castillo, M.D., Arumugam, S., Chambon, V., Lamaze, C., Wunder, C., Kenworthy, A.K., *et al.* (2015). Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. Nature *517*, 493-496.

Reuther, G.W., and Der, C.J. (2000). The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. Curr Opin Cell Biol *12*, 157-165.

Ringstad, N., Gad, H., Low, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O., and De Camilli, P. (1999). Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. Neuron *24*, 143-154. Ringstad, N., Nemoto, Y., and De Camilli, P. (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 8569-8574.

Rivas, M.P., Kearns, B.G., Xie, Z., Guo, S., Sekar, M.C., Hosaka, K., Kagiwada, S., York, J.D., and Bankaitis, V.A. (1999). Pleiotropic alterations in lipid metabolism in yeast sac1 mutants: relationship to "bypass Sec14p" and inositol auxotrophy. Mol Biol Cell *10*, 2235-2250.

Robinson, M.S., and Bonifacino, J.S. (2001). Adaptor-related proteins. Curr Opin Cell Biol *13*, 444-453. Rohde, G., Wenzel, D., and Haucke, V. (2002). A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within mu2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. J Cell Biol *158*, 209-214.

Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., and Anderson, R.G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell *68*, 673-682.

Safari, F., and Suetsugu, S. (2012). The BAR Domain Superfamily Proteins from Subcellular Structures to Human Diseases. Membranes (Basel) *2*, 91-117.

Sakagami, H. (2008). The EFA6 family: guanine nucleotide exchange factors for ADP ribosylation factor 6 at neuronal synapses. Tohoku J Exp Med *214*, 191-198.

Sakagami, H., Honma, T., Sukegawa, J., Owada, Y., Yanagisawa, T., and Kondo, H. (2007). Somatodendritic localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6, and its possible interaction with alpha-actinin in dendritic spines. Eur J Neurosci *25*, 618-628.

Salim, K., Bottomley, M.J., Querfurth, E., Zvelebil, M.J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R.L., Gigg, R., Smith, C.I., Driscoll, P.C., *et al.* (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. EMBO J *15*, 6241-6250.

Sallese, M., Mariggio, S., D'Urbano, E., Iacovelli, L., and De Blasi, A. (2000). Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. Mol Pharmacol *57*, 826-831.

Samatar, A.A., and Poulikakos, P.I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. Nat Rev Drug Discov 13, 928-942.

Sannerud, R., Declerck, I., Peric, A., Raemaekers, T., Menendez, G., Zhou, L., Veerle, B., Coen, K., Munck, S., De Strooper, B., *et al.* (2011). ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, E559-568.

Sato, P.Y., Chuprun, J.K., Schwartz, M., and Koch, W.J. (2015). The evolving impact of g proteincoupled receptor kinases in cardiac health and disease. Physiol Rev *95*, 377-404.

Sauvonnet, N., Dujeancourt, A., and Dautry-Varsat, A. (2005). Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. J Cell Biol *168*, 155-163.

Schertler, G.F., Villa, C., and Henderson, R. (1993). Projection structure of rhodopsin. Nature *362*, 770-772.

Schweitzer, J.K., and D'Souza-Schorey, C. (2005). A requirement for ARF6 during the completion of cytokinesis. Exp Cell Res *311*, 74-83.

Schweitzer, J.K., Pietrini, S.D., and D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-mediated endosome recycling reverses lipid accumulation defects in Niemann-Pick Type C disease. PLoS One *4*, e5193.

Schweitzer, J.K., Sedgwick, A.E., and D'Souza-Schorey, C. (2011). ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. Semin Cell Dev Biol *22*, 39-47.

Sendide, K., Reiner, N.E., Lee, J.S., Bourgoin, S., Talal, A., and Hmama, Z. (2005). Cross-talk between CD14 and complement receptor 3 promotes phagocytosis of mycobacteria: regulation by phosphatidylinositol 3-kinase and cytohesin-1. J Immunol *174*, 4210-4219.

Sharma, D.K., Brown, J.C., Choudhury, A., Peterson, T.E., Holicky, E., Marks, D.L., Simari, R., Parton, R.G., and Pagano, R.E. (2004). Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. Mol Biol Cell *15*, 3114-3122.

Shaul, P.W., and Anderson, R.G. (1998). Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. Am J Physiol *275*, L843-851.

Shen, X., Meza-Carmen, V., Puxeddu, E., Wang, G., Moss, J., and Vaughan, M. (2008). Interaction of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein (BIG) 1 and kinesin motor protein KIF21A. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 18788-18793.

Shilton, B.H., McDowell, J.H., Smith, W.C., and Hargrave, P.A. (2002). The solution structure and activation of visual arrestin studied by small-angle X-ray scattering. Eur J Biochem *269*, 3801-3809.

Shin, H.W., Shinotsuka, C., Torii, S., Murakami, K., and Nakayama, K. (1997). Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p. J Biochem *122*, 525-530.

Shin, O.H., and Exton, J.H. (2001). Differential binding of arfaptin 2/POR1 to ADP-ribosylation factors and Rac1. Biochem Biophys Res Commun *285*, 1267-1273.

Shinotsuka, C., Waguri, S., Wakasugi, M., Uchiyama, Y., and Nakayama, K. (2002). Dominant-negative mutant of BIG2, an ARF-guanine nucleotide exchange factor, specifically affects membrane trafficking from the trans-Golgi network through inhibiting membrane association of AP-1 and GGA coat proteins. Biochem Biophys Res Commun *294*, 254-260.

Shome, K., Nie, Y., and Romero, G. (1998). ADP-ribosylation factor proteins mediate agonist-induced activation of phospholipase D. J Biol Chem *273*, 30836-30841.

Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P., and Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 2760-2765.

Sinha, B., Koster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R.V., Butler-Browne, G., Vedie, B., Johannes, L., *et al.* (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. Cell *144*, 402-413.

Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N., and van der Bliek, A.M. (1998). A human dynaminrelated protein controls the distribution of mitochondria. J Cell Biol *143*, 351-358.

Smith, C.J., Grigorieff, N., and Pearse, B.M. (1998). Clathrin coats at 21 A resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors. EMBO J *17*, 4943-4953.

Someya, A., Moss, J., and Nagaoka, I. (2006). Involvement of a guanine nucleotide-exchange protein, ARF-GEP100/BRAG2a, in the apoptotic cell death of monocytic phagocytes. J Leukoc Biol *80*, 915-921. Someya, A., Moss, J., and Nagaoka, I. (2010). The guanine nucleotide exchange protein for ADP-ribosylation factor 6, ARF-GEP100/BRAG2, regulates phagocytosis of monocytic phagocytes in an ARF6-dependent process. J Biol Chem *285*, 30698-30707.

Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. Mol Biol Cell *11*, 325-337.

Stalder, D., Barelli, H., Gautier, R., Macia, E., Jackson, C.L., and Antonny, B. (2011). Kinetic studies of the Arf activator Arno on model membranes in the presence of Arf effectors suggest control by a positive feedback loop. J Biol Chem *286*, 3873-3883.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 513-525. Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 195-208.

Subtil, A., Hemar, A., and Dautry-Varsat, A. (1994). Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. J Cell Sci *107 (Pt 12)*, 3461-3468.

Sugiura, H., Iwata, K., Matsuoka, M., Hayashi, H., Takemiya, T., Yasuda, S., Ichikawa, M., Yamauchi, T., Mehlen, P., Haga, T., *et al.* (2004). Inhibitory role of endophilin 3 in receptor-mediated endocytosis. J Biol Chem *279*, 23343-23348.

Sundborger, A., Soderblom, C., Vorontsova, O., Evergren, E., Hinshaw, J.E., and Shupliakov, O. (2011). An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. J Cell Sci *124*, 133-143.

Sverdlov, M., Shinin, V., Place, A.T., Castellon, M., and Minshall, R.D. (2009). Filamin A regulates caveolae internalization and trafficking in endothelial cells. Mol Biol Cell *20*, 4531-4540.

Szczepanowska, J. (2009). Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. Acta Biochim Pol *56*, 225-234.

Takahashi, Y., Meyerkord, C.L., and Wang, H.G. (2009). Bif-1/endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy. Cell Death Differ *16*, 947-955.

Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. Physiol Rev 81, 153-208.

Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H., and Mitaku, S. (2002). Identification of G proteincoupled receptor genes from the human genome sequence. FEBS Lett *520*, 97-101.

Tang, W., Tam, J.H., Seah, C., Chiu, J., Tyrer, A., Cregan, S.P., Meakin, S.O., and Pasternak, S.H. (2015). Arf6 controls beta-amyloid production by regulating macropinocytosis of the Amyloid Precursor Protein to lysosomes. Mol Brain *8*, 41.

Taylor, M.J., Perrais, D., and Merrifield, C.J. (2011). A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. PLoS Biol *9*, e1000604.

Theard, D., Labarrade, F., Partisani, M., Milanini, J., Sakagami, H., Fon, E.A., Wood, S.A., Franco, M., and Luton, F. (2010). USP9x-mediated deubiquitination of EFA6 regulates de novo tight junction assembly. Embo J *29*, 1499-1509.

Traub, L.M. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 583-596.

Ungewickell, E., and Branton, D. (1981). Assembly units of clathrin coats. Nature 289, 420-422.

Vaid, K.S., Guttman, J.A., Babyak, N., Deng, W., McNiven, M.A., Mochizuki, N., Finlay, B.B., and Vogl, A.W. (2007). The role of dynamin 3 in the testis. J Cell Physiol *210*, 644-654.

Valentich, J.D., Popov, V., Saada, J.I., and Powell, D.W. (1997). Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. Am J Physiol *272*, C1513-1524.

van der Bliek, A.M., Redelmeier, T.E., Damke, H., Tisdale, E.J., Meyerowitz, E.M., and Schmid, S.L. (1993). Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. J Cell Biol *122*, 553-563.

Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science *294*, 1299-1304.

Wandinger-Ness, A., and Zerial, M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. Cold Spring Harb Perspect Biol *6*, a022616.

Wang, Q., Navarro, M.V., Peng, G., Molinelli, E., Goh, S.L., Judson, B.L., Rajashankar, K.R., and Sondermann, H. (2009). Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 12700-12705.

Wang, Y.J., Wang, J., Sun, H.Q., Martinez, M., Sun, Y.X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J.P., Roth, M.G., and Yin, H.L. (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. Cell *114*, 299-310.

Warnock, D.E., Baba, T., and Schmid, S.L. (1997). Ubiquitously expressed dynamin-II has a higher intrinsic GTPase activity and a greater propensity for self-assembly than neuronal dynamin-I. Mol Biol Cell *8*, 2553-2562.

Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci 118, 843-846.

Wong, A.S., Lee, R.H., Cheung, A.Y., Yeung, P.K., Chung, S.K., Cheung, Z.H., and Ip, N.Y. (2011). Cdk5mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease. Nat Cell Biol *13*, 568-579.

Wu, X., Gan, B., Yoo, Y., and Guan, J.L. (2005). FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. Dev Cell *9*, 185-196.

Xu, R., Zhang, Y., Gu, L., Zheng, J., Cui, J., Dong, J., and Du, J. (2015). Arf6 regulates EGF-induced internalization of E-cadherin in breast cancer cells. Cancer Cell Int *15*, 11.

Zangari, J., Partisani, M., Bertucci, F., Milanini, J., Bidaut, G., Berruyer-Pouyet, C., Finetti, P., Long, E., Brau, F., Cabaud, O., *et al.* (2014). EFA6B antagonizes breast cancer. Cancer Res *74*, 5493-5506.

Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C.C., Donaldson, J.G., and Greenberg, S. (1998). A requirement for ARF6 in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages. J Biol Chem *273*, 19977-19981.

## <u>Résumé</u>

La petite protéine G Arf6 et son facteur d'échange EFA6 sont des protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que le remodelage du cytosquelette d'actine, le transport vésiculaire et mise en place de la polarité épithéliale. Elles jouent un rôle dans la voie d'endocytose dépendante de la clathrine permettant notamment l'internalisation de certains récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Des études menées au laboratoire ont montré qu'Arf6 interagit avec le complexe adapteur AP-2 et forme un complexe avec EFA6 et la  $\beta$ -arrestine, une protéine nécessaire au recrutement des RCPGs dans les puits de clathrine. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à EFA6 afin de mieux comprendre son rôle dans le trafic vésiculaire. La recherche de nouveaux partenaires d'EFA6 menée au laboratoire nous a permis d'identifier l'endophiline comme protéine pouvant interagir avec EFA6. L'endophiline est une protéine à domaine N-BAR impliquée dans différentes étapes de l'endocytose dépendante de la clathrine, de la formation de la vésicule au désassemblage du manteau. Nous avons pu confirmer une interaction directe et identifier le domaine N-BAR de l'endophiline et le domaine catalytique d'EFA6, le domaine Sec7, comme étant responsables de cette interaction. Ainsi nous avons mis en évidence pour la première fois une interaction entre le domaine Sec7 d'EFA6 et une protéine autre que son substrat Arf6. Nous avons montré que l'endophiline stimule l'activité catalytique d'EFA6 sur l'échange nucléotidique d'Arf6. Nous avons également démontré que le degré de courbure des membranes régule l'interaction entre EFA6 et le domaine N-BAR. Enfin, nous avons observé qu'EFA6 est capable de redistribuer partiellement l'endophiline au niveau de la membrane plasmique et que la surexpression de l'endophiline lève l'effet inhibiteur d'EFA6 sur l'internalisation de la transferrine. Les résultats obtenus nous permettent de proposer un modèle selon lequel EFA6 recrute l'endophiline au niveau de zones planes de la membrane plasmique pour contrôler l'activation d'Arf6 et l'endocytose dépendante de la clathrine.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes qui régulent l'activité d'EFA6. Nous avons mis en évidence que le domaine PH d'EFA6 n'est pas auto-inhibiteur et qu'il potentialise fortement l'activité catalytique d'EFA6 sur des membranes lipidiques artificielles. Nous avons également observé que l'activité **d'EFA6 est régulée par le produit de la réaction qu'elle catalyse, Arf6-GTP, qui en interagissant avec le domaine PH-C-terminal exerce une boucle de rétrocontrôle négative.** Enfin, nous avons observé que l'interaction entre le domaine C-terminal et certains de ces partenaires, notamment la  $\beta$ -arrestine, était inhibée par la présence du domaine PH et avons démontré une **interaction entre le domaine C-terminal, suggérant un repli intramoléculaire au sein de la protéine**. Nous avons également démontré une interaction directe entre le domaine C-terminal d'EFA6 et la protéine Arf6-GDP. Cette interaction semble piéger Arf6GDP et inhiber fortement son activation.

Ces résultats mettent en évidence la présence de différents mécanismes moléculaires qui régulent l'activité catalytique et l'interaction d'EFA6 avec ses différents partenaires. Ces mécanismes contrôlent ainsi la fonction de ce facteur d'échange au sein de la cellule.

## Abstract

The small G protein Arf6 and its exchange factor EFA6 control numerous cellular processes such as actin cytoskeleton remodeling, vesicular transport and apico-basal cell polarity. They are involved in clathrin dependant endocytosis which mediates internalization of some G-Protein Coupled Receptor (GPCR). Studies led in the laboratory have shown that Arf6 interacts directly with the clathrin adaptator complex AP-2 and forms a complex with EFA6 and  $\beta$ -arrestin, the latter playing a key role in the recruitment of GPCRs to clathrin-coated pits. Here we focused on EFA6 for determining its role in vesicular trafficking.

We identified endophilin as a new EFA6 partner. Endophilin is a N-BAR domain containing protein involved at different stages of clathrin-mediated endocytosis, from membrane deformation to vesicles uncoating. We confirmed the direct interaction and identified the N-BAR domain of endophilin and the catalytic Sec7 domain of EFA6 as the binding regions. Interestingly, we showed for the first time that the Sec7 domain of EFA6 could interact with a protein besides its substrate Arf6. We observed that endophilin stimulates the catalytic activity of EFA6 on Arf6. We also demonstrated that the membrane curvature regulates the interaction between the Sec7 domain and the N-BAR domain. The expression of EFA6 recruits endophilin to EFA6-positive plasma membrane ruffles, whereas expression of endophilin rescues the EFA6-mediated inhibition of transferrin internalization. Altogether our results support a model whereby **EFA6 recruits endophilin to flat areas of the plasma membrane to control Arf6 activation and clathrin-mediated endocytosis**.

Next, we focused on the molecular mechanisms that regulate EFA6 activity. We showed that the PH domain of EFA6 isn't auto-inhibitory and strongly stimulates EFA6 catalytic activity on artificial membrane. We also observed that the activity of EFA6 is regulated by the product of the reaction it catalyses, Arf6-GTP. **Arf6-GTP**, *via* an interaction with the EFA6 PH-C-terminus domain, mediates a negative feedback loop.

Finally, we observed that the PH domain inhibits the interaction between the C-terminus domain and some of its partners such as  $\beta$ -arrestin. We showed an **interaction between the PH and the C-terminus domains, suggesting an intramolecular folding of the protein**. We also demonstrated that Arf6-GDP interacts directly with the C-terminus domain of EFA6. This interaction seems to trap Arf6-GDP and strongly inhibits its activation.

All our results indicate that the catalytic activity of EFA6 and the interaction with its partners are regulated by different molecular mechanisms, all of which controlling EFA6 functions in cells.