



Etude du rôle de la protéine Alix dans l'endocytose

Vincent Mercier

► To cite this version:

Vincent Mercier. Etude du rôle de la protéine Alix dans l'endocytose. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. ⟨NNT : 2015GREAV059⟩. ⟨tel-01685657⟩

HAL Id: tel-01685657

<https://theses.hal.science/tel-01685657v1>

Submitted on 16 Jan 2018

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Vincent Mercier

Thèse dirigée par **Fiona Hemming**
codirigée par **Anne Petiot**

préparée au sein du **Grenoble Institut des Neurosciences -**
INSERM U836 – Equipe : Neurodégénérescence et Plasticité
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Etude du rôle de la protéine Alix dans l'endocytose

Thèse soutenue publiquement le **27 avril 2015**,
devant le jury composé de :

Alain Buisson

Professeur – Université Joseph Fourier – Grenoble, **Président**

Jean Gruenberg

Professeur – Université de Geneve - **Rapporteur**

Christophe Lamaze

Directeur de recherche – Institut Curie – Paris, **Rapporteur**

Michel Franco

Chercheur CNRS – IPMC – Valbonne, **Examineur**

Olivier Dostaing

Chercheur INSERM – IAB – Grenoble, **Examineur**

Anne Petiot

Chercheur INSERM – GIN – Grenoble, **Examineur**



Remerciements

Dans un premier temps, un grand merci aux membres du jury de thèse, Christophe Lamaze, Jean Gruenberg, Olivier Destaing, Michel Franco et Alain Buisson pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Un grand merci à Rémy Sadoul qui dirige le laboratoire dégénérescence et plasticité dans lequel j'ai effectué ma thèse, pour m'avoir recruté, fait confiance et un peu remué quand c'était nécessaire. Tu as toujours été là pour discuter sciences et penser à de nouvelles manips. Sans toi, ce travail n'aurait pas été accompli. Je te remercie aussi pour tous les moments sympas (avec des mets de qualité et de très bons vins !) qu'on a passé tous ensemble, notamment au chalet ou à Montbonnot. Enfin, merci d'avoir été mon meilleur « client » pour les truffes, je pense que tu mérites une carte fidélité avec la dixième truffe de 100 g offerte...

Merci à Anne qui m'a eu comme « boulet » du M1 jusqu'à la fin de ma thèse. Merci de m'avoir toujours soutenu, formé pour la majorité des techniques que j'ai appréhendées et aidé à progresser sur ce sujet ainsi qu'à la rédaction de cette thèse. Tu as su me canaliser, moi qui ai parfois tendance à partir dans tous les sens et tu as également supporté mon désordre et ma procrastination ainsi que le fait qu'il m'est parfois difficile de faire deux choses à la fois... (normal, je suis un garçon me diras-tu...). Merci également à Fiona pour sa gentillesse et tous ses conseils, notamment en microscopie électronique. De façon générale, merci à l'équipe 2, vous êtes tous des gens remarquables (Sandrine, Yves, Karine, Karine, Fred). Un grand merci à Béra pour être si agréable et humaine et pour l'aide que tu m'as apportée en BM... Christine, je me souviendrai toujours ton étonnement de ma tristesse lors du décès de Georges Moustaki (« tu le connaissais... ? », sous-entendu, en fait, tu es complètement « has been »). Je vous souhaite à tous bien du bonheur.

Je remercie l'école doctorale chimie et sciences du vivant pour m'avoir attribué une bourse du ministère de la recherche de 3 ans. Je remercie l'UJF et le corps enseignant pour tous les conseils lors de mon activité d'enseignement. Merci particulièrement à Marina Gromova pour m'avoir fait confiance en me confiant un cours magistral de master 1 en microscopie électronique.

Je remercie bien sûr les thésards de chez Sadoul, vous allez tous me manquer. Merci à Marinette, ma collègue de promo depuis la L1 qui est devenue une amie depuis le M2. Nos discussions et nos apéros toujours raisonnables vont me manquer... Je te souhaite bonne chance pour la fin de ta thèse et j'espère vraiment que je pourrai assister à ta soutenance... Romain, avec qui je partageais des mardis matins migraineux et qui est depuis en post doc aux États-Unis. Je te souhaite plein de réussite dans ta carrière et de ménager ta cirrhose du foie (idem pour Marine)... Mathilde, la spécialiste des exosomes maintenant en Italie. Charlotte, à qui je demande pardon pour l'avoir autant taquiné... Même si je reconnais que sur la fin, l'élève commençait à dépasser

le maître, bien joué le coup des triplés, 1 chance sur 160 000 ... Un bisou à Elya que je ne connais pas encore.

Alexis, un autre ami thésard, bien que tu aies déserté les soirées depuis un certain temps, j'espère qu'on ne perdra pas le contact et je te souhaite tout le courage nécessaire pour la fin de ta thèse. Un grand merci aux collègues post doc ou thésards du bureau et de l'institut pour les bons moments passés ensemble: Bastien, Christelle, Brice, Mathieu, Fanny, Anouk, Marc, Maxime, Anthony, Marie-Lise, Eléa, Hélène, Lucie, Annece, Fabienne, Julie, Amandine, ... et pardon pour tous ceux que j'oublie !

Merci à mes amis pour leur soutien inconditionnel : Koullou, Piero, Jérémion, le No, Nico, Mounsi, Emilien... Une pensée aussi à tous les collègues de promo et surtout Matthieu et Jessica, je leur souhaite bonne chance pour la suite.

Merci à Karin et Julie pour leur gentillesse et pour m'avoir formé à la microscopie électronique ainsi qu'à Alain Buisson pour toutes nos discussions et ses conseils pour le FRAP. Merci à Jacques pour notre collaboration, les discussions sciences très dynamiques et tes conseils en stats. Olivier pour ton aide, nos discussions scientifiques et ta bienveillance... ça m'a touché. Merci à Eric pour sa bonne humeur et ses conseils sur ImagesJ ainsi qu'à Christophe pour ses conseils informatiques et pour avoir été mon deuxième meilleur client truffe de l'institut. De façon générale, une pensée à tous les gens de l'étage que j'ai côtoyé quasiment quotidiennement pendant ces 4 dernières années...

Un très grand merci à ma famille qui a toujours été là pour moi et qui est un élément central dans ma vie. Plus particulièrement à mes parents, que je ne changerais pour rien au monde et qui m'ont toujours encouragés et à mon Fréro, qui s'éclate en Amérique du sud pour un temps indéterminé pendant que je g***** avec cette thèse... Tu as raison, profite bien ! Merci à Jango qui m'a soutenu à sa manière lors de la rédaction du manuscrit (principalement en roupillant et ronflant à mes côtés...).

Enfin, le meilleur pour la fin, un merci tout particulier pour (M)Adeline qui m'a soutenue, encouragée et supportée tout au long de ce travail et même au delà... Je suis vraiment heureux de t'avoir à mes côtés et tout semble plus facile avec toi. Merci aussi à toute ta famille que j'apprécie beaucoup.

Abréviations principales

ALG-2 : Apoptosis Linked gene 2
Alix : ALG-2 Interacting protein X
ALPS: ArfGAP1 Lipid-Packing Sensor
ANTH: AP180 N-Terminal Homology
AP-2: Adaptor Protein 2
APP: Amyloid Precursor Protein
Arf6: ADP Ribosylation Factor 6
Arp2/3: Actin Related Protein 2/3
ATP: Adenosine TriPhosphate
BAR: Bin, Amphiphysin, Rvs
Cdc42: Cell Division Control protein 42 homolog
CDR: Circular Dorsal Ruffle
CHMP: CHarged Multivesicular body Protein
CIE: Clathrin Independent Endocytosis
CIN85: Cbl Interacting of 85 kD
CLASP: CLathrin-coat Associated Sorting Protein
CLIC: CLathrin Independent Cargo
CME: Clathrin Mediated Endocytosis
CTxB: B subunit of Cholera Toxin
DRM: Detergents Resistant Membrane
EE: Early Endosome
EEA1: Early Endocytic Antigen 1
EGFR: Epithelium Growth Factor Receptor
EMV: Endosome Multi Vésiculé
ENTH: Epsin N-Terminal Homology
ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FCHo: Fer/Cip4 Homology domain-only
FEME: Fast Endophilin Mediated Endocytosis
FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching
FYVE: Fab1, YOTB, Vac1, EEA1
GAP : GTPase Activating Protein
GEEC: GPI Enriched Early Compartment
GEF: Guanine Exchange Factor
GFP : Green Fluorescent Protein
GPI: GlycosylPhosphatidylInositol
GRAF1: GTPase Regulator Associated with Focal adhesion kinase-1
GSL: GlycoSphingoLipid
GUV: Giant Unilamellar Vesicle
HDPTP: His Domain PhosphoTyrosine Phosphatase
IL2R: InterLeukin 2 Receptor
ILV: Intra Luminal Vesicle
LBPA: LysoBiPhosphatidic Acid
MEF: Mouse Embryonic Fibroblast
MVB: Multivesicular Body

NPF: Nucleating Promoting Factor
PH: Pleckstrin Homology
PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinases
PI3P: Phosphatidylinositol-3-Phosphate
PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-diPhosphate
PRD: Prolin Rich Domain
PX: PhoX
Rac1: RAs-related C3 botulinum toxin substrate 1
SH3: Src Homology type 3
STxB: B subunit of Shiga Toxin
Tf: Transferrin
Tsg101: Tumor Susceptibility Gene 101
Vps: Vacuolar Protein Sorting
WASP: Wiskott–Aldrich Syndrome Protein
WAVE: WAsp family VErprolin homologous protein

Sommaire

Introduction	1
1. L'endocytose.....	3
1.1 Introduction générale	3
1.2 Le remodelage des membranes	4
1.2.1 Principes physiques généraux pour déformer une membrane	4
1.2.2 Protéines qui déforment les membranes.....	8
1.2.2.1 Les protéines à domaine BAR	8
1.2.2.2 Protéines à domaine ENTH	12
1.2.2.3 Les protéines à domaine ANTH	13
1.2.2.4 Les protéines à domaine ALPS	14
1.2.2.5 Les complexes ESCRT	15
1.2.3 Rôle des lipides dans les déformations membranaires.....	17
1.3 L'endocytose dépendante de la clathrine (CME).....	20
1.3.1 Recrutement des cargos et du manteau de clathrine.....	20
1.3.2 Formation/maturation de la vésicule	22
1.3.3 Fission de la vésicule.....	25
1.3.4 L'actine dans la CME.....	26
1.4 Voies d'endocytose indépendantes de la clathrine (CIE)	27
1.4.1 Rôle des lipides dans la CIE.....	29
1.4.2 Rôle de l'actine dans les CIE	31
1.4.2.1 Fonctionnement de l'actine et de sa machinerie.....	31
1.4.2.2 Implication de l'actine et sa machinerie dans les CIE	33
1.4.3 CIE à petite échelle	34
1.4.3.1 Les cavéoles.....	34
1.4.3.2 La voie flotilline	36
1.4.3.3 La voie CLIC/GEEC	37

1.4.3.4 La voie Arf6.....	41
1.4.3.5 La voie IL2R.....	42
1.4.3.6 La voie médiée par les endophilines (FEME : Fast Endophilin Mediated Endocytosis)	44
1.4.3.7 L'endocytose de l'EGFR	46
1.4.4 Les voies d'endocytose à grande échelle	49
1.4.4.1 Macropinocytose et Circular Dorsal Ruffle (CDR).....	49
1.4.4.2 La phagocytose	51
1.3 Le trafic endolysosomal	52
1.3.1 L'endosome précoce (EE)	53
1.3.2 Formation des vésicules intra-luminales (ILV) des endosomes.....	56
1.3.2.1 Découverte des ESCRT	56
1.3.2.2 Mécanisme de formation des ILV par les ESCRT	58
1.3.2.3 Formation des ILV par le LBPA	60
1.3.3 L'endosome multivésiculé (EMV).....	61
1.3.4 Le lysosome.....	63
1.5 Endocytose et pathologies.....	63
2. La protéine Alix	65
2.1 Structure et sites d'interaction de la protéines Alix	65
2.2 Partenaires et fonctions d'Alix.....	67
2.2.1 La formation des ILV	67
2.2.1.1 Alix et les ESCRT	68
2.2.1.2 Alix et le LBPA	69
2.2.1.3 Alix et la syndécan, synténine	71
2.2.2 Alix et l'internalisation.....	73
2.2.1.1 Alix et CIN85	73
2.2.1.2 Alix et la Galectine-3.....	74
2.2.3 Alix et les endophilines	75
2.2.4 Alix et la régulation du cytosquelette d'actine.....	75
2.2.5 Alix et le bourgeonnement des virus enveloppés.....	76
2.2.6 Alix et la cytokinèse	77

2.2.7 Alix et la mort cellulaire programmée.....	78
2.2.8 Alix et l'autophagie.....	79
2.2.9 Alix et la réparation membranaire.....	80
3. But de l'étude	82
Résultats	84
1. La protéine Alix est impliquée dans l'endocytose indépendante de la clathrine	88
Article : ALG-2 interacting protein-X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis.....	
Vincent Mercier^{1,2} , Marine Laporte^{1,2}, Olivier Destaing^{3,4,5}, Béatrice Blot^{1,2}, Karin Pernet-Gallay^{1,2}, Yasmina Saoudi^{1,2}, Corinne Albiges-Rizo^{3,4,5}, Sandrine Fraboulet^{1,2}, Anne Petiot^{1,2} and Rémy Sadoul^{1,2,*}	
2. Résultats complémentaires de l'étude.....	127
2.1 Le trafic antérograde n'est pas affecté par l'absence d'Alix	127
2.2 Le LBPA et le cholestérol ne sont pas perturbés dans les MEF ko Alix	128
2.3 Alix s'associe à la membrane plasmique	129
2.4 Alix est présente dans les DRM.....	131
2.5 GPI-GFP est moins mobile, sous la membrane plasmique, dans les MEF ko Alix..	132
2.6 Effet de différents mutants d'Alix sur l'internalisation de la CTxB	132
2.7 Rôle des partenaires ESCRT d'Alix dans la CIE de la CTxB	134
Discussion	137
1. La déplétion d'Alix ralentie la dégradation de l'EGFR sans altérer de façon majeure le trafic endosomal ou la formation des ILV	140
2. La CIE est spécifiquement inhibée dans les MEF ko Alix alors que la CME est intacte.....	143
3. Alix et ses partenaires dans la CIE	143
3.1 Alix/CIN85	144
3.2 Alix/endophilines.....	144
3.3 Alix/Galectin 3.....	145
3.4 Alix/ESCRT.....	145
3.4 Alix/actine.....	146
4. Alix régule l'internalisation de la CTxB avec les endophilines	146

5. Recrutement d'Alix aux sites d'endocytose de la CTxB	148
6. L'inhibition de la CIE dans les MEF ko Alix est associée à des perturbations de la physiologie cellulaire	150
7. Conclusion générale.....	152
Références bibliographiques	153

Introduction

1. L'endocytose

1.1 Introduction générale

Le terme générique d'endocytose, désigne l'ensemble des processus permettant à une cellule de prendre en charge du matériel extracellulaire (liquide ou solide) en les englobant dans des vésicules dérivées de la membrane plasmique. Ce processus est à l'origine de la production, *de novo*, de membrane interne provenant de la bicouche lipidique et assure l'entrée dans la cellule de nutriments et de molécules effectrices (hormones, facteurs de croissance, anticorps...). L'endocytose est également empruntée par certains pathogènes (virus et toxines bactériennes)(Pelkmans and Helenius, 2003) afin de pénétrer dans la cellule. Le matériel ainsi internalisé à la membrane plasmique est ensuite transféré vers un ensemble hétérogène de vésicules regroupées sous le nom de compartiment endocytaire. A partir de ces compartiments, le matériel endocyté (les récepteurs protéiques par exemple) va pouvoir être, soit recyclé à la membrane plasmique, soit, dégradé dans un compartiment spécialisé appelé lysosome (Klumperman and Raposo, 2014). Une fine régulation de l'endocytose est donc cruciale pour permettre le maintien de l'homéostasie cellulaire.

Selon le type de matériel endocyté et les acteurs moléculaires impliqués dans l'internalisation, une nomenclature spécifique est utilisée. On parle ainsi d'endocytose dite dépendante de la clathrine (CME : Clathrin Mediated Endocytosis), lorsque la clathrine est utilisée pour déformer la membrane plasmique et former la vésicule d'endocytose. Parallèlement à la CME, l'endocytose indépendante de la clathrine (CIE : Clathrin Independent Endocytosis), regroupe un ensemble de mécanismes permettant une internalisation dépendante du cholestérol et de l'actine et indépendante de la clathrine (Figure 1).

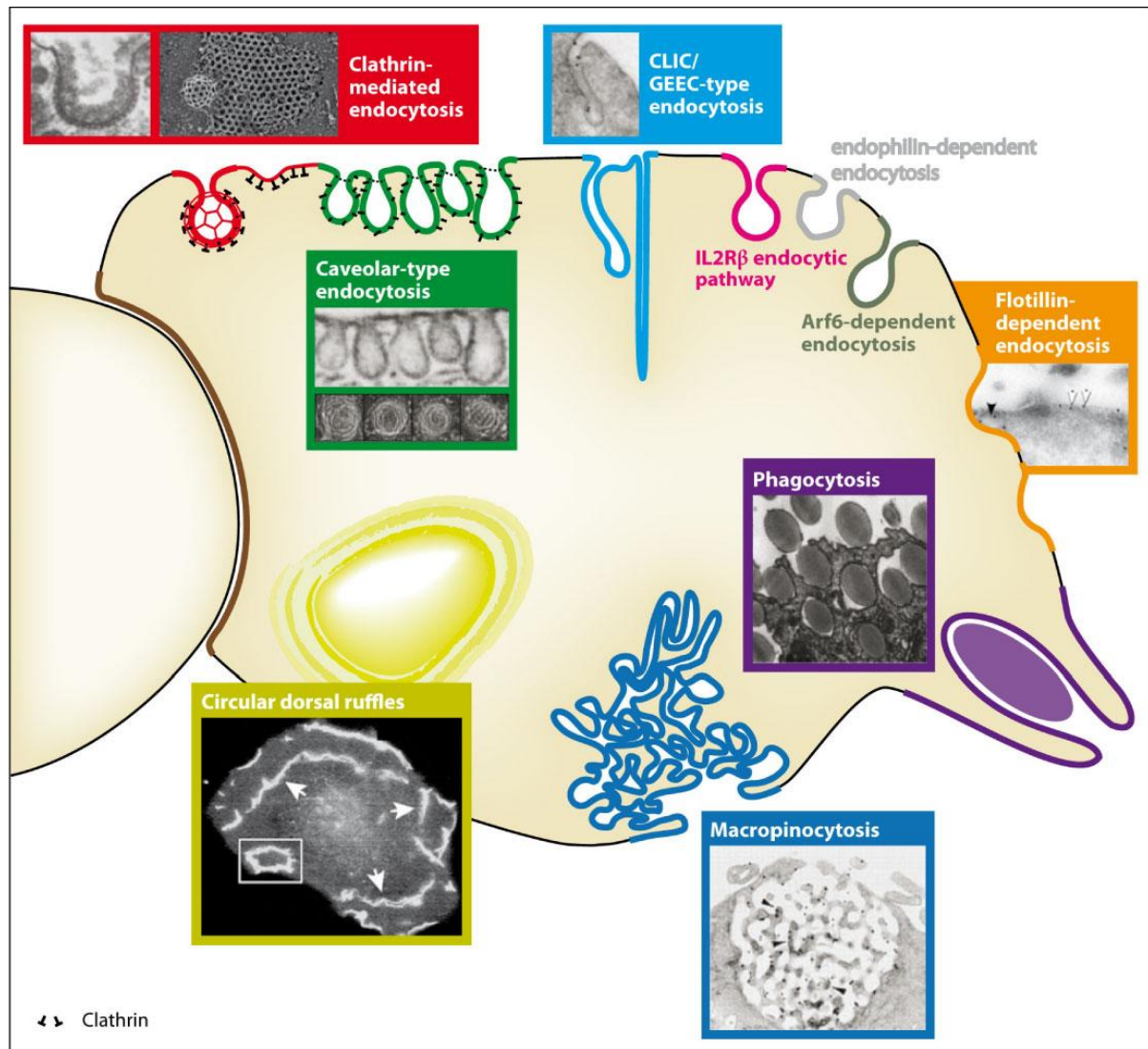


Figure 1 : Les différentes voies d'endocytose.

En rouge, la CME utilise la polymérisation de la clathrine afin de former la vésicule d'endocytose. Les autres couleurs représentent des CIE qui ne nécessitent pas la clathrine pour former la vésicule d'endocytose mais toutes sont sensibles à des agents qui perturbent le cholestérol. (Adapté de Doherty et McMahon 2009)

1.2 Le remodelage des membranes

Les différentes voies d'endocytose diffèrent principalement par les mécanismes moléculaires mis en jeu afin de déformer la membrane plasmique et ainsi former la vésicule d'endocytose. Avant de décrire en détail les différentes voies d'endocytose, nous allons brièvement décrire les principes physiques qui conditionnent les déformations des membranes biologiques puis les acteurs moléculaires impliqués dans ces déformations.

1.2.1 Principes physiques généraux pour déformer une membrane

De manière générale, une membrane plate est à l'état d'équilibre et nécessite un apport d'énergie pour sa déformation. Cette énergie dépend directement de la rigidité de la membrane (Helfrich 1973), caractérisée par son module de rigidité de flexion (κ), qui varie selon la composition lipidique de la membrane. En général, la présence de chaînes acyle insaturées diminue κ alors que la présence de chaînes acyle saturées et de cholestérol l'augmente (Rawicz et al., 2000), ce qui rend plus énergétique la déformation de ces membranes. Ainsi, la rigidité de flexion d'une membrane composée de radeaux lipidiques (sphingolipides et cholestérol) et de phospholipides vaut environ 60 fois l'énergie thermique (Roux et al., 2005) donnée par : kT (k est la constante de Boltzmann et T la température absolue) alors qu'elle vaut deux fois moins pour un mélange de phospholipides insaturés et de cholestérol (Pan et al., 2009).

Une membrane biologique est une bicouche lipidique. Tant que les deux feuilletts de la bicouche ont la même surface, aucune flexion n'a lieu, par contre, quand les feuilletts sont asymétriques (le nombre de lipides ou de protéines insérés différents de part et d'autre), la membrane fléchit. L'énergie libre par unité de surface, nécessaire à la courbure de la membrane, est donnée par l'équation de Helfrich :

$$F_{\text{bending}} = \frac{\kappa}{2} \times (C - C_0)^2$$

Où C est (à un facteur 2 près) une grandeur géométrique appelée « courbure moyenne », qui décrit la courbure membranaire imposée et C_0 est la courbure membranaire spontanée (La courbure membranaire spontanée d'une membrane plate est égale à 0). Cette équation traduit le fait que la flexion de la membrane est une déformation élastique, la courbure se comportant comme l'extension d'un ressort. De façon générale, la courbure d'une surface peut être positive ou négative, selon la convexité de la surface. Les déformations de la membrane plasmique se caractérisent donc également par le signe de la courbure. Cependant, en biologie cellulaire, ce signe est attribué en fonction, non d'un calcul mathématique, mais de considérations qualitatives. Si une protéine cytosolique se lie au feuillet cytoplasmique de la bicouche et induit une déformation vers l'intérieur, cette courbure est appelée positive. A l'inverse, une déformation vers l'intérieur par une protéine qui se lie au feuillet du côté extracellulaire sera appelée courbure négative (Figure 2). Cette induction de courbure membranaire négative est utilisée par de nombreux pathogènes pour pénétrer dans la cellule

(Romer et al., 2007 ; Ewers et al., 2010 ; Rossman and Lamb., 2011). C'est le cas par exemple de toxines bactériennes qui se lient aux glycosphingolipides (GSL) telles que la toxine du choléra (CTxB) ou la toxine de Shiga (STxB) et qui, en formant des domaines, vont engendrer une asymétrie de part et d'autre de la membrane, ce qui induit sa déformation (Johannes et al., 2014).

De nombreux mécanismes peuvent induire une courbure membranaire spontanée positive. C'est la cas par exemple de protéines qui insèrent des structures amphiphiles ou hydrophobes dans un des feuillet de la membrane (Antonny, 2011), de protéines transmembranaires (Aimon et al., 2014) ou encore de protéines qui lient la membrane (protéines à domaine BAR, ENTH...).

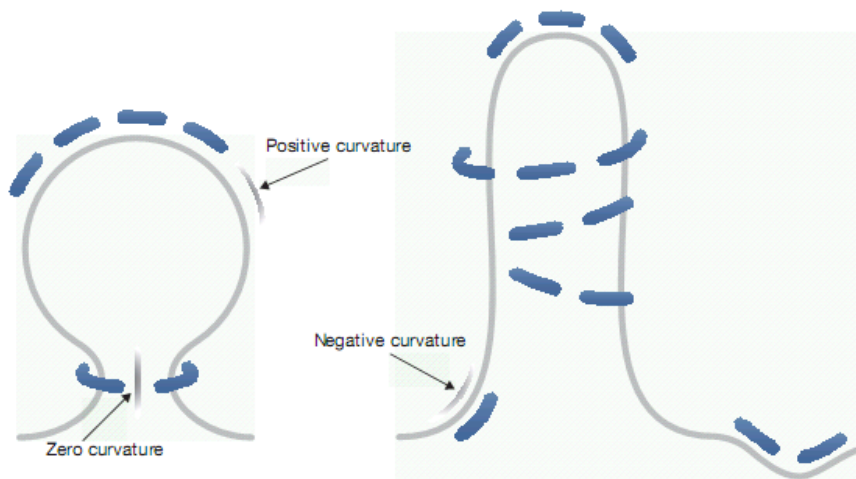


Figure 2 : Courbures positives et négatives.

Des protéines peuvent sentir et induire des courbures positives ou négatives de la membrane Adapté de Kirschhausen 2012

Les protéines qui ont la capacité de déformer les membranes peuvent le faire de plusieurs manières. Cette déformation peut résulter, d'une modification de la symétrie de la bicouche lipidique (CTxB, GPI-AP), de l'interaction avec la membrane de protéines d'échafaudage comme les protéines à domaine BAR (Mim and Unger., 2012), d'un effet d'entassement qui crée une pression latérale sur la membrane (Stachowiak et al., 2010, 2012), de la formation d'un manteau protéique autour de la membrane (clathrine, COP 1 et 2, Dynamine, F-BAR) ou encore d'une force de traction exercée sur la membrane (Kinesine, Myosine) (Roux et al., 2002 ; Koster et al., 2003) (Figure 3).

Un autre facteur très important à prendre en compte pour la déformation membranaire est la tension de ligne. Ce phénomène se caractérise par le fait qu'une déformation peut avoir lieu au niveau de micro domaines lipidiques en absence de protéines ou d'asymétrie de la bicouche, mais simplement suite à la juxtaposition de région de composition différentes, entraînant un défaut d'alignement des lipides. Ce défaut d'alignement induit l'exposition de la partie hydrophobe des lipides à l'eau ou de la partie hydrophile aux lipides voisins (Johannes and Mayor., 2010). Un exemple concret de ce phénomène est le regroupement des GSL qu'entraîne la liaison de toxines (CTxB, STxB) et qui forme un domaine plus épais que la membrane environnante (Römer et al., 2007). La tension de ligne produit alors une constriction qui minimise la longueur de la frontière entre les domaines, dans le but de réduire la taille du domaine et de ce fait la pénalité énergétique. Cet effet est contrebalancé par la déformation de la membrane aux limites du domaine. Cependant, la tension de ligne seule n'est pas suffisante pour produire de petites vésicules puisque la taille minimale de vésicule qu'elle peut engendrer est d'environ 300 nm ($R_{min} \approx \frac{4\kappa}{\gamma}$; où γ est la tension de ligne), des protéines sont donc nécessaires pour produire les vésicules d'endocytose observables dans les cellules (Johannes et al., 2014).

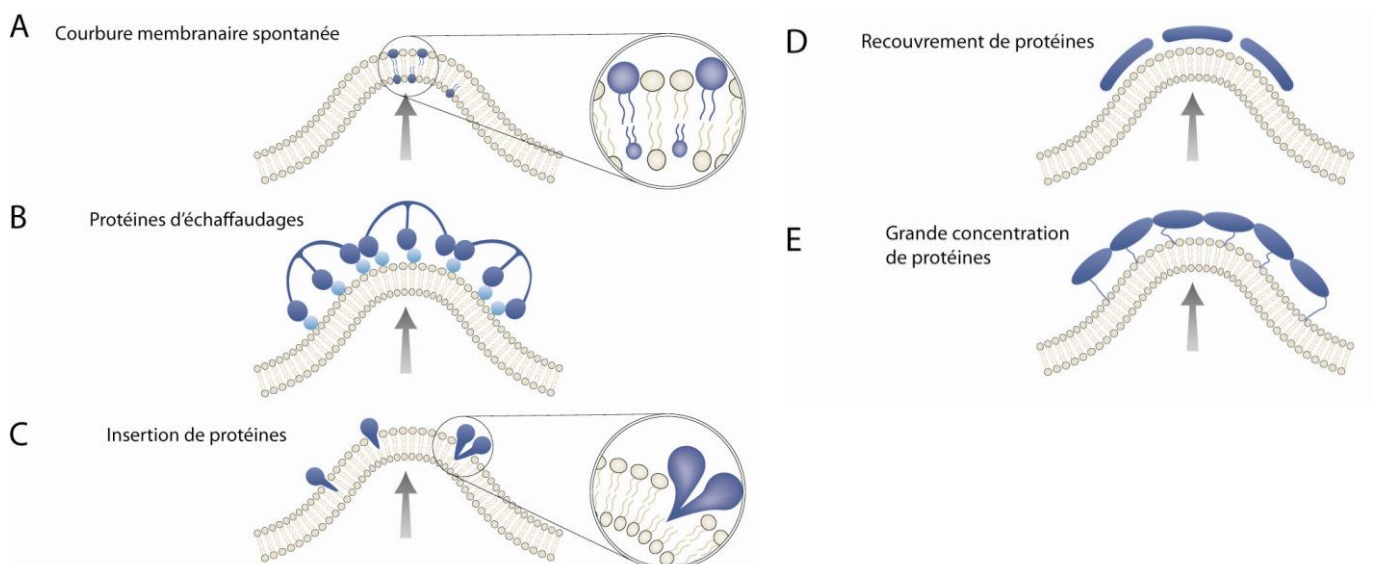


Figure 3 : Mécanismes pour générer une courbure membranaire.

(A) Courbure spontanée de la membrane, générée par des lipides qui ont une « grosse » tête polaire par rapport à leur chaîne acyle (courbure positive) ou inversement comme dans le cas du cholestérol (courbure négative). (B) Courbure intracellulaire générée par un assemblage de protéines d'échafaudage. Ce mécanisme est le plus fréquent dans le cadre de la CME. (C) Courbure générée par l'insertion asymétrique de domaines protéiques (hydrophobes ou amphipatiques) dans la bicouche. (D) Courbure générée par des protéines incurvées qui adhèrent à la membrane. (E) Courbure de la membrane générée par une grande concentration de protéines même si elles n'interagissent pas directement avec la membrane. Adapté de kirchausen 2012

1.2.2 Protéines qui déforment les membranes

Domaines	Type	Protéines	Fonctions principales	Rôle majeur pour
BAR	F-BAR	FCHo, PACSIN CIP4...	Détection et induction de faibles courbures (+) assemblage du manteau de clathrine	CME
	I-BAR	IRSp53 IRTKS...	Détection et induction de courbures (-)	Protrusions membranaires
	BAR/ N-BAR	Endophilines, GRAF1 amphiphysine...	Détection et induction de fortes courbures (+), insertion (hélice amphipathique, N-BAR), assemblage clathrine	CME, CIE
	BAR-PH	APPL1, ASAP1...	Détection et induction de fortes courbures positives liaison des phosphoinositides (domaine PH)	CME
	BAR-PX	SNX1, SNX5, SNX18...	Détection et induction de fortes courbures (+) liaison des phosphoinositides (domaine PX)	CME
ENTH		Epsine 1, 2, 2B, 3, R	Détection et induction de courbures (+), interaction PI insertion (hélice amphipathique), assemblage clathrine	CME
ANTH		AP180, PICALM Hip1, Hip1R	Interaction phosphoinositides assemblage du manteau de clathrine	CME
ALPS		ArfGAP1, EHD4...	Détection et induction de courbure insertion (hélice amphipathique)	CME, formation vésicules golgiennes

Table 1 : Tableau récapitulatif de protéines à domaine impliquées dans les déformations membranaires, abordées dans ce manuscrit.

1.2.2.1 Les protéines à domaine BAR

Le domaine BAR (Bin Amphiphysin Rvs) est un domaine très conservé à travers les espèces et est retrouvé dans plus de 35 protéines chez l'homme. Une homologie de séquence entre les protéines de mammifères Bin1 (Myc box-dependent-interacting protein 1) et Amphiphysine et les protéines de levure Rvs167p et Rvs161p a été à l'origine de la caractérisation de ce domaine BAR (Lichte et al, 1992). Par la suite, d'autres protéines à domaine BAR ont été identifiées et cette famille a été étendue aux protéines ayant une forte similarité de structure. Les protéines à domaine BAR sont des protéines d'échafaudage qui regroupent les protéines portant un domaine FCH-BAR/F-BAR (Fer-CIP4 homology), un domaine I-BAR (Inverted BAR) ou un domaine BAR (Figure 4A) (Frost et al., 2009). Les protéines de la famille BAR ont ensuite été divisées en quatre sous-familles : les BAR « classiques », les N-BAR dont le domaine BAR possède un domaine N-terminal amphipathique, les BAR-PH qui possèdent un domaine PH (Pleckstrin Homology) et les BAR-PX qui possèdent un domaine Phox (Qualmann et al, 2011).

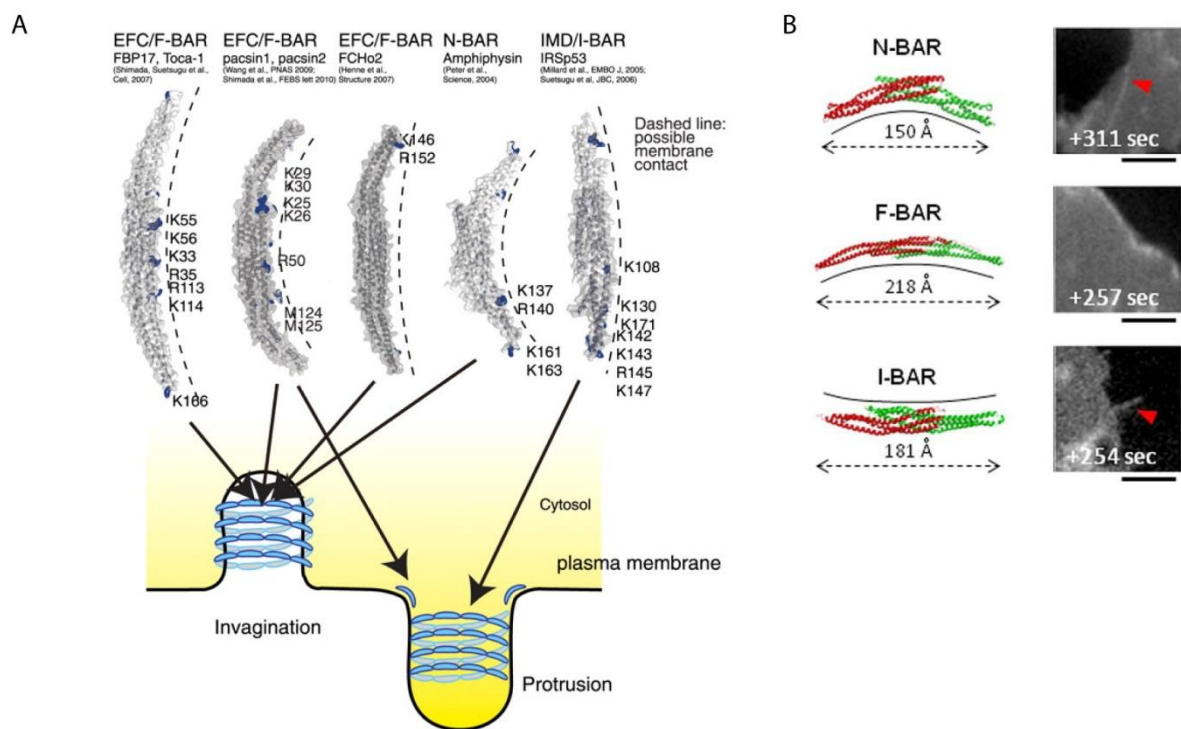


Figure 4 : Structure des différents domaines BAR et topologie des déformations membranaires.

A) Exemple de structures des domaines F-BAR (FBP17, pacsin et FCHo2), N-BAR (amphiphysine) et I-BAR (IRSp53). Les acides aminés qui interagissent avec la membrane, représentée en pointillé, sont indiqués. Les domaines BAR et F-BAR sentent et induisent des courbures positives de la membrane (comme dans le cas des invaginations). Le domaine I-BAR sent et induit des courbures négatives de la membrane (comme dans le cas des protrusions). Adapté de Suetsegu et al., 2010

B) Exemple d'invaginations ou de protrusion formées *in cellulo* par différents domaines BAR. Adapté de Suarez et al., 2014

La majorité des protéines à domaine BAR possède un ou plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine comme le domaine SH3 (Src homology type 3) à l'origine de leur fonction d'échafaudage. Ainsi, de nombreuses protéines à domaine BAR peuvent interagir, via ce domaine SH3, avec des facteurs activant la polymérisation de l'actine branchée comme WAVE (Wasp family Verprolin homologous protein), N-WASP (Neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein) ou WASH (Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homologue) (Suetsugu & Gautreau, 2012). Ces protéines à domaine BAR sont de ce fait impliquées dans différents processus cellulaires comme l'endocytose (endophilines, nexines, amphiphysines...) ou la réorganisation de l'actine (RhoGAP, RhoGEF).

Les domaines BAR ont une forme caractéristique de « banane » et se lient aux lipides de la membrane (phosphosérines, phosphoinositides) via des interactions électrostatiques entre leur partie basique chargée positivement et les têtes polaires des lipides chargées négativement

(Peter et al., 2004 ; Gallop et McMahon., 2005 ; Safari & Suetsugu, 2012). D'un point de vue structural, le domaine BAR est composé de 3 hélices alpha, en conformation hélice-boucle-hélice, qui s'homo- ou s'hétérodimérisent en formant une structure incurvée. Une partie du dimère est chargé positivement, sur sa face convexe ou concave, selon le type de domaine BAR (Figure 4B). Certaines protéines comme les endophilines ou les PACSIN (Protein kinase C And Casein kinase substrate In Neurons protein), ont en plus de ce domaine, des boucles hydrophobes ou des hélices amphipatiques qui peuvent s'insérer dans la membrane (Frost et al., 2009).

Les protéines à domaine BAR, détectent les courbures membranaires, à faible concentration, et participent aux courbures à de plus fortes concentrations (Sorre et al., 2012). Ainsi, à forte concentration, les protéines à domaine I-BAR induisent des courbures négatives de la membrane (vers l'extérieur), les protéines à domaine F-BAR induisent de faibles courbures positives de la membrane et les protéines BAR induisent de fortes courbures positives (Gallop and McMahon, 2005; Millard et al, 2005 ; Shimada et al., 2007 ; Henne et al., 2007) (Figure 4).

Les protéines à domaine BAR ou F-BAR peuvent, à elles seules, déformer les membranes puisque elles induisent une tubulation vers l'extérieur lorsqu'elles sont incubées sur de grosses vésicules lipidiques de synthèse (GUV : Giant Unilamellar Vesicle), *in vitro* (Shi and Baumgart, 2015). A l'opposé, les protéines à domaines I-BAR ou IF-BAR vont former des tubules à l'intérieur des GUV (Saarikangas et al, 2009; Suetsugu et al, 2006).

Certaines protéines à domaine BAR, telle qu'IRSp53 (Insulin Receptor Substrate p5), ont été associées à la formation des protrusions membranaires (Krugmann et al, 2001; Miki et al, 2000; Nakagawa et al, 2003). En effet, IRSp53, qui possède un domaine I-BAR, permet de favoriser la polymérisation de l'actine en interagissant, via un domaine SH3, avec de nombreux facteurs qui régulent ce phénomène comme Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog), Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), N-WASP ou WAVE (Lim et al, 2008; Miki et al, 2000). Ce domaine SH3 est également nécessaire pour induire la localisation d'IRSp53 à la membrane plasmique (Robens et al, 2010). D'autres protéines à domaine I-BAR, IF-BAR ou F-BAR ont depuis été impliquées dans la formation de protrusions membranaires (Coutinho-Budd et al, 2012; Guerrier et al, 2009; Qualmann and Kelly, 2000). Ces protéines pourraient permettre de réguler la polymérisation de l'actine lors de la formation des protrusions, puisqu'elles ont toutes la capacité d'interagir avec des régulateurs de la polymérisation de l'actine branchée comme N-WASP ou WAVE (Bu et al,

2009; Linkermann et al, 2009; Machesky and Johnston, 2007; Qualmann et al, 1999; Shimada et al, 2007).

Les protéines à domaine BAR ou F-BAR ont la particularité d'être également impliquées dans des processus d'invaginations de la membrane plasmique au cours de l'endocytose (Bu et al, 2009; Shimada et al, 2007). Ce rôle a été bien caractérisé dans le contexte de la CME ou au moins cinq protéines à domaine BAR (Endophiline2, Bin1, Amphyphisine1, SNX9 (Sortin Nexin 9) et APPL1 (Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1)) ont été impliquées. De plus, cinq protéines à domaine F-BAR (FCHo1/2 (Fer/Cip4 homology domain-only proteins 1 and 2), PACSIN2, FBP17 (formin-binding protein 17) et CIP4 (Cdc42 Interacting Protein 4)) ont également été impliquées dans la CME (Qualmann et al, 2011) (Figure 5).

Récemment, une étude menée par le groupe de Merrifield (Taylor et al, 2011) a permis d'analyser la cinétique de recrutement des protéines à domaine BAR aux puits de clathrine avec une résolution temporelle d'environ 2 secondes. Ces travaux suggèrent une corrélation entre l'ordre d'intervention de ces protéines et la courbure de la membrane durant la formation de la vésicule. Les premières protéines recrutées seraient donc les protéines à domaine F-BAR, comme les FCHo, qui induisent de faibles courbures membranaires et initient la formation du puits. Les protéines à domaine BAR, qui permettent les fortes courbures, seraient à leur tour recrutées; permettant d'achever la formation de la vésicule et de la stabiliser (Qualmann et al, 2011; Taylor et al, 2011) (Figure 5). Des protéines à domaine ENTH, qui ont un rôle similaire dans la déformation des membranes, sont également recrutées lors de la formation de la vésicule. Il a été proposé que le recrutement successif de cette grande variété de protéines impliquées dans la courbure membranaire pourrait permettre un « contrôle qualité » de la vésicule en formation (Mettlen et al, 2009).

D'autre part, certaines protéines à domaine BAR telles que les endophilines ou GRAF1 (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase-1) ont également été plus récemment impliquées dans la CIE (Boucrot et al., 2014 ; Lundmark et al., 2008). Ces protéines seraient importantes pour déformer la membrane plasmique et permettre ainsi l'internalisation du cargo CIE (Boucrot et al., 2014 ; Lundmark et al., 2008). En plus de cette activité de déformation, l'endophiline A2 jouerait également un rôle dans la fission de la vésicule d'internalisation lors de la CIE de toxines bactériennes (Renard et al., 2014).

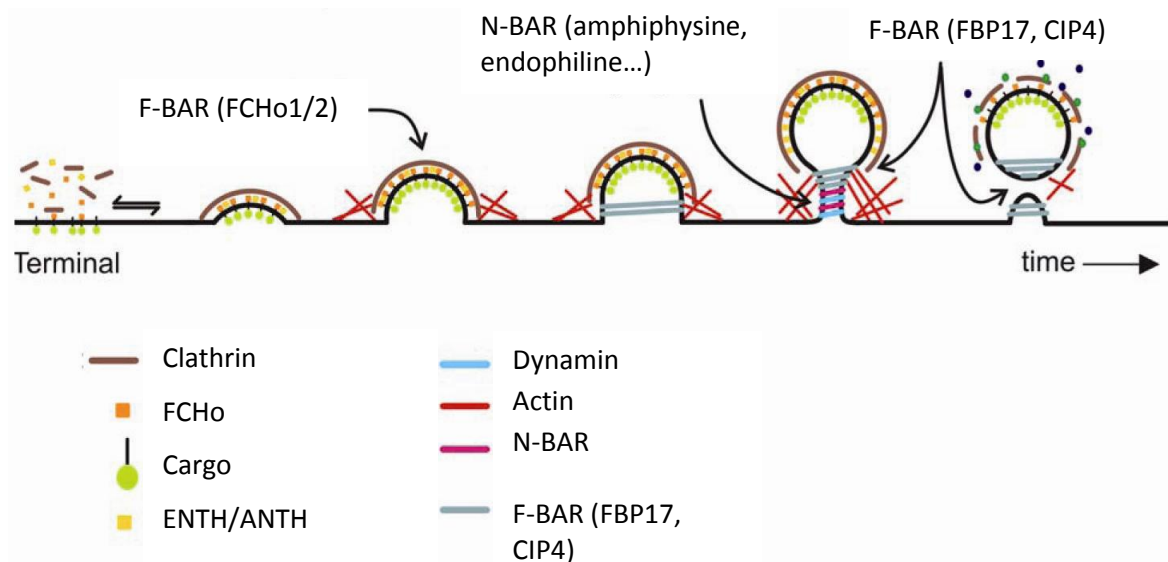


Figure 5 : Cinétique de recrutement des protéines à domaine BAR au puit de clathrine.

Les protéines à domaine F-BAR (FCHo1/2) sont recrutées précocement au niveau du puit, les protéines à domaine N-BAR sont recrutées à leur tour et permettent d'achever la formation de la vésicule. D'autres protéines à domaine F-BAR (FBP17, CIP4) sont recrutées tardivement et aident à la scission de la vésicule. (Adapté de Taylor et al., 2011)

1.2.2.2 Protéines à domaine ENTH

Le domaine ENTH (Epsin N-Terminal Homology) a initialement été caractérisé comme un domaine d'interaction avec le domaine EH (Eps15 Homology) d'Eps15 (Epidermal growth factor receptor substrate 15) (Rosenthal et al, 1999). L'Eps15 est une protéine impliquée dans l'internalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et participe à l'assemblage du manteau de clathrine. La famille de protéines à domaine ENTH, est composée de cinq protéines appelées; epsin1, 2, 2B, 3 et R (Eps15 Interactor). Le domaine ENTH est un domaine d'environ 150 acides aminés toujours situé en région N terminale. D'un point de vue structural, il a une forme globulaire et est composé de neuf hélices. Il a été montré que ce domaine reconnaît spécifiquement le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) et le PIP3 (phosphatidylinositol-1,4,5-diphosphate) (Lemmon et al., 2008) (Figure 6). Les protéines à domaine ENTH peuvent s'insérer dans les membranes à l'aide d'une hélice amphipathique et former des tubules à partir de liposomes *in vitro* et *in cellulo* (Ford et al, 2002). Ces protéines ont également la capacité de lier des tubules préexistants (Capraro et al, 2010). Ainsi, comme les protéines à domaine BAR, les protéines à domaine ENTH peuvent à la fois détecter et induire des courbures membranaires. Il a été montré que dans la CME, les epsines peuvent

interagir avec, la clathrine, son adaptateur AP-2 (Chen et al., 1998), ou des récepteurs ubiquitinylés comme l'EGFR (Hawryluk et al., 2006). La cinétique de recrutement de l'epsine2 à la membrane plasmique est analogue à celle de la clathrine (Taylor et al, 2011), ce qui suggère un rôle précoce des epsines durant la CME. Pourtant la déplétion ou l'expression d'un dominant négatif de l'epsine1 ne semble pas avoir d'effet sur l'endocytose de la transferrine (Huang et al, 2004a; Sigismund et al, 2005) alors que la maturation de la vésicule à clathrine semble affectée (Mettlen et al, 2009). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par une compensation par l'epsine 2 dont l'expression est similaire à l'expression de l'epsine 1 dans les tissus, ou par la spécificité de ces protéines en fonction des cargos à internaliser (Rosenthal et al, 1999).

1.2.2.3 Les protéines à domaine ANTH

Le domaine ANTH (AP180 N-Terminal Homology) ou CALM (Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid) est très proche du domaine ENTH et a été défini par homologie de séquence avec ce dernier. Toutes les protéines à domaine ANTH connues sont impliquées dans la CME et possèdent un motif d'interaction avec la clathrine. Le domaine ANTH peut reconnaître les phosphoinositides comme le PIP2 ou le PIP3 mais il ne peut pas induire la tubulation de liposomes *in vitro* contrairement au domaine ENTH (Lemmon 2008; Ford et al, 2001) (Figure 6). Quatre protéines à domaine ANTH ont été décrites : AP180 (adaptor protein 180), PICALM (Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein), Hip1 (Huntingtin Interacting Protein 1) et Hip1R (Hip1 Related). Durant l'endocytose, les protéines à domaine ANTH sont recrutées précocement afin de permettre l'assemblage du manteau de clathrine (Taylor et al, 2011) (Figure 5). Certaines protéines, comme Hip1 et Hip1R, sont recrutées au niveau du puits recouvert de clathrine indépendamment de leur domaine ANTH, mais celui-ci est nécessaire à la fonction des protéines puisque son absence inhibe l'internalisation dépendante de la clathrine (Gottfried et al, 2009).

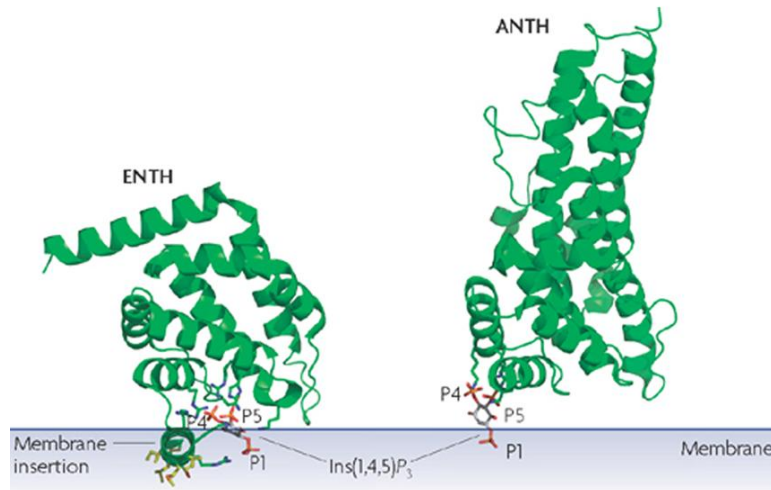


Figure 6 : Les domaines ENTH ou ANTH peuvent lier les phosphoinositides à la membrane plasmique

Représentation des domaines ENTH de l'epsine et ANTH d'AP180. Ces deux domaines ont la capacité d'interagir avec des phosphoinositides comme le PIP3. L'hélice amphipathique du domaine ENTH s'insère dans la membrane et induit ainsi sa déformation. Adapté de Lemmon 2008

1.2.2.4 Les protéines à domaine ALPS

Le domaine ALPS (ArfGAP1 lipid-packing sensor) a initialement été caractérisé dans la protéine ArfGAP1 (ADP-ribosylation factor GTPase-Activating Protein 1) (Bigay et al, 2005), une protéine notamment impliquée dans le démantèlement du manteau formé par COP1 (Coat Protein 1) sur les vésicules golgiennes (Antonny et al., 2011). Plus généralement, les protéines de la famille ArfGAP sont des régulateurs des protéines Arf, des petites GTP-ases impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine et dans le trafic vésiculaire (Randazzo and Hirsch, 2004).

Le domaine ALPS contient une hélice amphipathique qui reconnaît les défauts de groupements des lipides et qui peut s'intercaler entre les têtes hydrophiles des lipides qui ne sont pas jointes les unes aux autres; ce phénomène étant notamment une conséquence d'une courbure membranaire (Bigay et al, 2005; Drin et al, 2007). Ce domaine permet donc de sentir et faciliter une courbure déjà existante (Figure 7). Il y a quelques années, une étude *in silico* a permis d'identifier 196 protéines portant potentiellement ce motif (Drin et al, 2007). Certaines de ces protéines sont impliquées dans l'endocytose comme EHD4 (Epsin15 Homology Domain containing 4), ou PICALM, mais le rôle du domaine ALPS sur la fonction et la localisation de ces protéines n'a pas encore été étudiée.

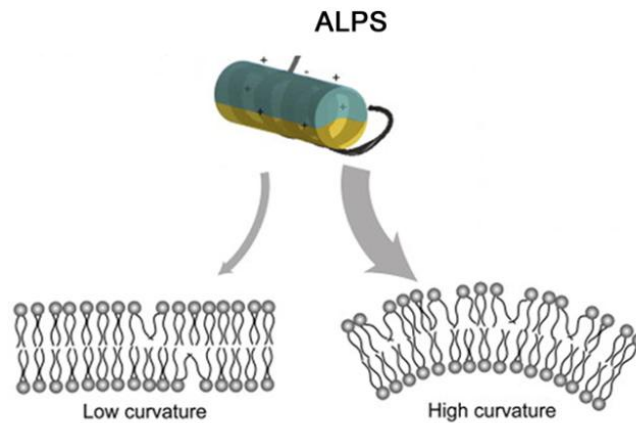


Figure 7 : Le domaine ALPS

Ce domaine est composé d'une hélice amphipathique s'insérant préférentiellement dans les membranes incurvées, probablement en conséquence des défauts de jonction des lipides. Adapté de Madsen et al., 2010

1.2.2.5 Les complexes ESCRT

Les complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), formés d'ESCRT 0, ESCRT I, ESCRT II et ESCRT III, sont capables de déformer les membranes mais également de réaliser l'étape de scission membranaire. Les complexes ESCRT sont recrutés successivement et s'assemblent sur la face cytosolique des membranes. Ils permettent l'induction d'un bourgeonnement de la membrane qui va conduire à la formation d'un cou membranaire, à l'intérieur duquel les sous unités ESCRT III vont polymériser et conduire à la fission. Ce phénomène est observé dans plusieurs processus cellulaires qui présentent tous la même topologie de déformation membranaire tels que la cytokinèse, le bourgeonnement des virus enveloppés ou encore la formation des vésicules intra-luminales (ILV) des endosomes que je détaillerai un peu plus loin. Dans tout ces processus, les ESCRT participent à une courbure négative de la membrane et ont tendance à rapprocher les bicouches lipidiques ce qui entraîne la fission (Henne et al., 2011 ; Hurley et Hanson, 2010). Certaines sous unités d'ESCRT III sont capables, lorsqu'elles sont surexprimées, de déformer la membrane plasmique. Ainsi, il a été montré que CHMP2B (CHarged Multivesicular body Protein) est capable, lorsqu'elle est surexprimée, de polymériser sous forme d'hélice et ainsi déformer la membrane plasmique et former des protrusions (Bodon et al., 2011). La combinaison d'un motif N-terminal hydrophobe et de résidus chargés positivement est responsable de la

formation et de la constriction des protrusions induites par des protéines ESCRT III (Bodon et al., 2011). Les épines dendritiques, qui sont les terminaisons post-synaptiques des neurones, semblent enrichies en protéines ESCRT III et notamment en CHMP2B. La déplétion de CHMP2B affecte fortement la morphologie des épines dendritiques ce qui suggère un rôle clé d'ESCRT III dans leur morphogénèse (Chassefeyre et al., 2015). Dans ce contexte, le modèle proposé est qu'ESCRT III pourrait former un complexe permettant la formation et le maintien du cou de l'épine dendritique.

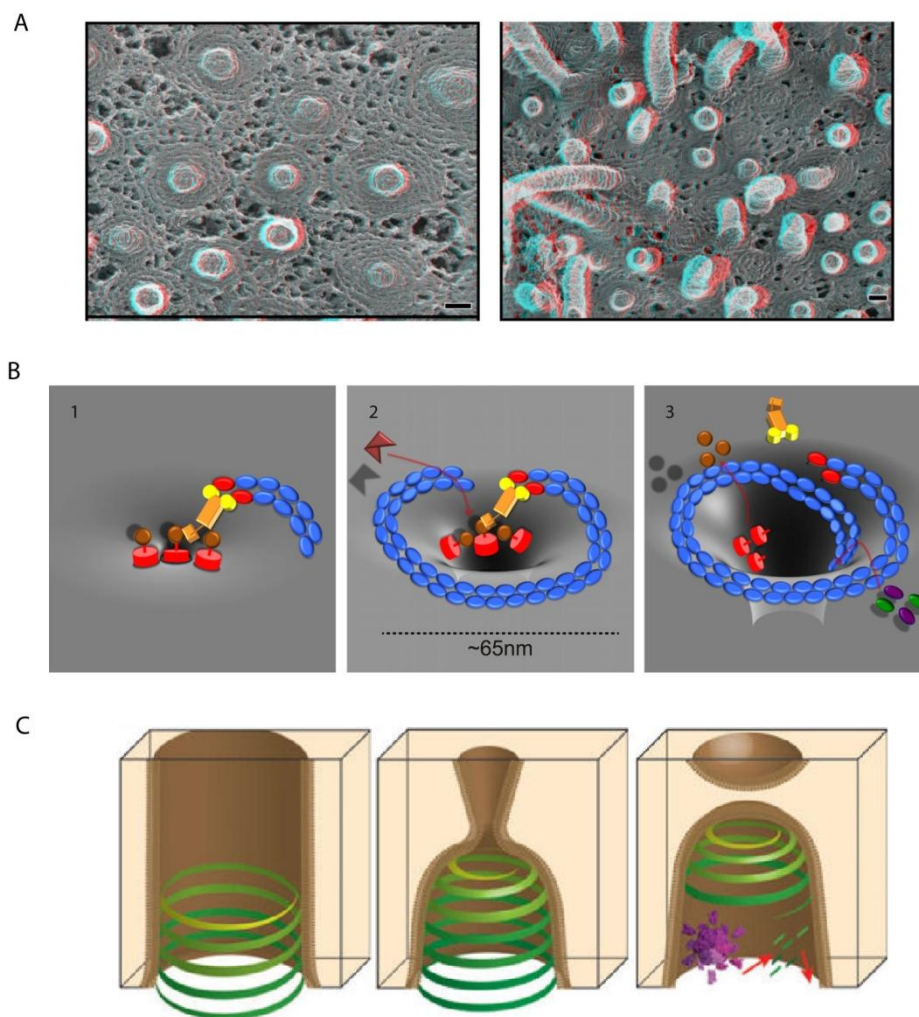


Figure 8 : Déformation membranaire par les complexes ESCRT.

A) La dépolymérisation d'ESCRT III a été bloquée dans des cellules COS-7 et les cellules ont été préparées par la technique de Deep Etch EM (DEEM). Des filaments circulaires formés par la polymérisation d'une sous unité d'ESCRT III sont observables. Ces filaments déforment la membrane plasmique. Adapté de Hanson et al., 2008

B) Les complexes ESCRT sont recrutés séquentiellement sur la membrane endosomale. (1) ESCRT II (jaune) recrute ESCRT III (rouge et bleu) qui, en polymérisant (2) déforme progressivement la membrane endosomale. Le complexe est ensuite désassemblé (3). Adapté de Henne et al., 2012

C) La polymérisation sous forme d'hélice d'ESCRT III va entraîner la fission membranaire. Adapté de McCullough et al., 2013

1.2.3 Rôle des lipides dans les déformations membranaires

Les lipides sont des composants majeurs des membranes biologiques et leurs caractéristiques physico-chimiques leur permettent d'interagir entre eux ou avec certaines protéines. Ils jouent de ce fait un rôle essentiel dans l'endocytose en modulant les propriétés physiques des membranes mais aussi en recrutant des protéines capables de déformer les membranes. Certaines toxines bactériennes ou certains virus utilisent également les lipides pour pénétrer dans la cellule (Ewers and Helenius, 2011). Dans cette partie, je décrirai brièvement le rôle essentiel des lipides dans les déformations membranaires et dans le recrutement de facteurs, lors de l'endocytose.

De façon générale, la composition en lipides influence localement l'élasticité et la rigidité de la membrane (Morlot et al., 2012), des propriétés cruciales pour déformer une membrane, notamment lors de l'endocytose.

Les membranes biologiques sont composées de centaines de lipides différents et la composition lipidique des feuillet, externe et interne, n'est pas identique (Janmey and Kinnunen, 2006). Ainsi, dans le cas de la membrane plasmique, les phosphoinositides (PI), phosphatidylethanolamine (PE) et la phosphatidylserine (PS) sont retrouvés exclusivement sur le feuillet interne de la membrane alors que les glycolipides, la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyeline (SM) sont présents seulement sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Figure 8).

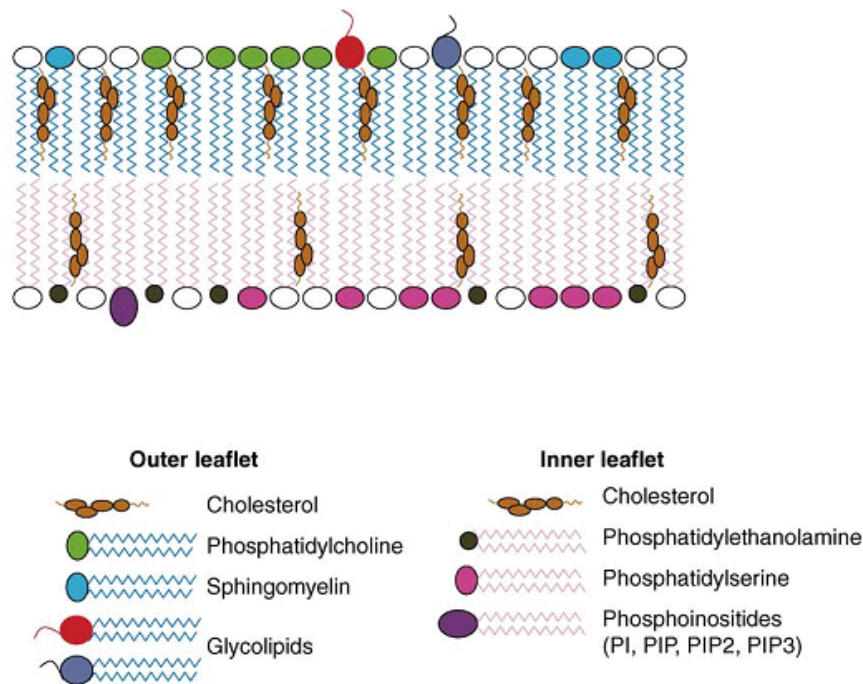


Figure 9 : Distribution des lipides de la membrane plasmique

La distribution des lipides est asymétrique au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, les glycolipides, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline sont retrouvés exclusivement sur le feuillet externe de la membrane alors que la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et les phosphoinositides sont retrouvés exclusivement sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Adapté de Janmey et al., 2006

Cette asymétrie de la composition lipidique, qui varie selon les compartiments cellulaires, est essentielle dans les processus de déformation membranaire. Les phospholipides retrouvés sur le feuillet interne vont ainsi générer une courbure spontanée par leur tendance à se regrouper préférentiellement dans des zones courbées de la membrane (Janmey et al., 2006).

L'acide phosphatidique (PA) (un lipide composé de deux chaînes carbonées hydrophobes et d'une tête polaire hydrophile très petite qui présente donc un encombrement stérique minimum) permettrait, lorsqu'il est inséré dans le feuillet interne des membranes, la formation d'une courbure négative de la membrane plasmique (Jenkins & Frohman, 2005).

Le LBPA, un phospholipide retrouvé exclusivement au niveau des endosomes, est impliqué dans la genèse des vésicules intra-luminales (ILV) (Matsuo et al., 2004).

En plus de leur rôle direct dans les déformations membranaires, les lipides sont également impliqués dans le recrutement de protéines qui déforment les membranes.

Ainsi, le PIP2 (Phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate) est reconnu par des protéines qui initient la courbure membranaire (protéines à domaine BAR, ANTH, ENTH) et permet l'assemblage du manteau de clathrine ainsi que le recrutement de la dynamine, une protéine impliquée dans la fission de la vésicule d'endocytose (Bohdanowicz and Grinstein, 2013 ; Jost et al., 1998). L'invagination de la membrane plasmique par la clathrine et sa machinerie se fera donc spécifiquement aux portions de la membrane enrichies en PIP2 et la déphosphorylation de ce lipide va permettre la dissociation du manteau de clathrine de la vésicule néoformée (Cremona et al, 1999).

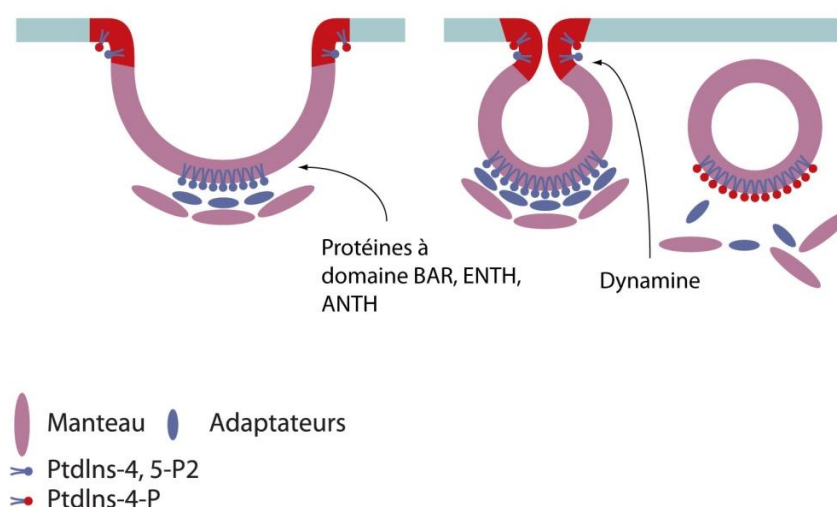


Figure 10 : Le PIP2 joue un rôle central dans la formation des vésicules à clathrine

Le PIP2 permet, de recruter des protéines à domaines impliqués dans la déformation de la membrane plasmique, l'assemblage du manteau de clathrine et la dynamine alors que la déphosphorylation du PIP2 en PIP permet la dissociation du manteau de clathrine. Adapté de Schmidt, 2002

En plus de la CME, le PIP2 a également été impliqué dans la voie CIE, médiée par les endophilines puisqu'il permet de recruter les endophilines, par l'intermédiaire de la lamellipodine, à la membrane plasmique (Boucrot et al., 2014).

Dans le cadre de la CIE, les lipides qui composent les radeaux lipidiques (lipid rafts) et plus particulièrement les SL et le cholestérol sont essentiels pour moduler les propriétés physiques de la membrane et recruter les facteurs nécessaires à la déformation de la membrane plasmique (Doherty and MacMahon, 2009). Je reparlerai plus tard du rôle des lipides dans la CIE.

1.3 L'endocytose dépendante de la clathrine (CME)

La CME est la voie d'internalisation la plus étudiée et de ce fait, la mieux comprise à l'heure actuelle. Dans cette voie d'internalisation, la vésicule d'endocytose est générée par la polymérisation de la clathrine qui forme un manteau protéique au niveau de la membrane plasmique (Kirchhausen, 2012). Ce manteau est parfaitement observable en microscopie électronique et donne un aspect caractéristique aux puits et vésicules recouverts de clathrine (Figure 11). La clathrine est composée de six chaînes polypeptidiques (trois chaînes lourdes et trois chaînes légères) assemblées en une structure à trois branches appelée triskèle. Ces triskèles peuvent s'auto-assembler pour former une cage rigide autour de la vésicule (Ungewickell and Branton, 1981) (Figure 11). Ce système permet de générer des vésicules de forme et de taille très homogène.

La CME est une voie endocytaire empruntée par un grand nombre de récepteurs transmembranaires tels que le récepteur à l'EGF (EGFR) ou à la transferrine (TfR). La formation de vésicules recouvertes de clathrine, morphologiquement très homogènes, requiert l'action concertée de plusieurs dizaines de protéines. Le processus de formation de telles vésicules peut être décomposé en trois étapes : la phase d'assemblage du manteau de clathrine et de concentration des récepteurs au niveau du futur puits à clathrine, la phase de formation/maturation de la vésicule et enfin la scission de la vésicule néoformée par la dynamine.

1.3.1 Recrutement des cargos et du manteau de clathrine

Dans un premier temps, des motifs spécifiques présents sur le cargo à internaliser sont reconnus par des protéines adaptatrices (CLASP : CLathrin-coat Associated Sorting Protein) à la membrane plasmique. Ces interactions vont entraîner la concentration des protéines transmembranaires au niveau de futurs puits recouverts de clathrine qui pourront, éventuellement, aboutir à la formation d'une vésicule recouverte de clathrine (Kirchhausen 2014). Parmi ces protéines adaptatrices, le complexe hétéro-tétramérique AP-2 (AP, Adaptor ou Assembly Protein) est central puisqu'il permet de recruter les cargos, d'autres protéines adaptatrices (stonine, β -arrestine), des protéines d'échafaudage (protéines à domaine BAR, ENTH...) ainsi que la clathrine. Ce complexe AP-2 est composé de deux grandes sous-unités d'environ 100 kDa appelées adaptine- α et adaptine- β 2, d'une sous-unité moyenne d'environ 50 kDa, l'adaptine- μ 2 et d'une petite sous-unité d'environ 17 kDa, l'adaptine- σ 2 (Kirchhausen, 1999). AP2 se lie simultanément au motif endocytaire des récepteurs

transmembranaire (via $\mu 2$ et $\sigma 2$) et aux triskèles de clathrine (via $\beta 2$) (Traub, 2009). AP2 reconnaît les motifs di -leucine ou Y-x-x-f (tyrosine-based motif, où x est non spécifié et f est un résidu hydrophobe de grande taille) dans le domaine cytoplasmique des protéines à endocyter et assure ainsi leur concentration dans les puits endocytaires. Pour le récepteur de la transferrine, le motif d'endocytose reconnu par AP2 est YTRF (Kirchhausen, 2014). D'autres protéines adaptatrices, comme la stonine, Dab2 (disabled homolog 2) ou encore la β -arrestine reconnaissent respectivement les cargos suivant : la synaptotagmine, le récepteur « Low Density Lipoprotein » (LDLR) et les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Diril et al., 2006; Ferguson et al., 1996; Keyel et al., 2006). Ces adaptateurs interagissent directement avec AP-2 et indirectement avec la clathrine. Les motifs reconnus par les protéines adaptatrices peuvent être des séquences d'acides aminés (YXX ϕ , (DE)XXXL(LIM), (FY)XNPX(YF)...), une phosphorylation ou une ubiquitination du récepteur à internaliser (Traub, 2009). Des dizaines d'autres protéines ont été décrites pour se lier à la clathrine ou à AP-2 et sont impliquées dans la formation des vésicules (Schmid et al., 2007 ; Traub et al., 2009) mais la fonction précise de beaucoup d'entre elles reste à ce jour inconnue.

La clathrine ne peut pas se lier directement à la membrane plasmique ou aux récepteurs transmembranaires, c'est pour cette raison que des protéines adaptatrices tel que le complexe AP-2 sont indispensables pour le recrutement et la polymérisation de la clathrine au niveau des futurs puits (Figure 12).

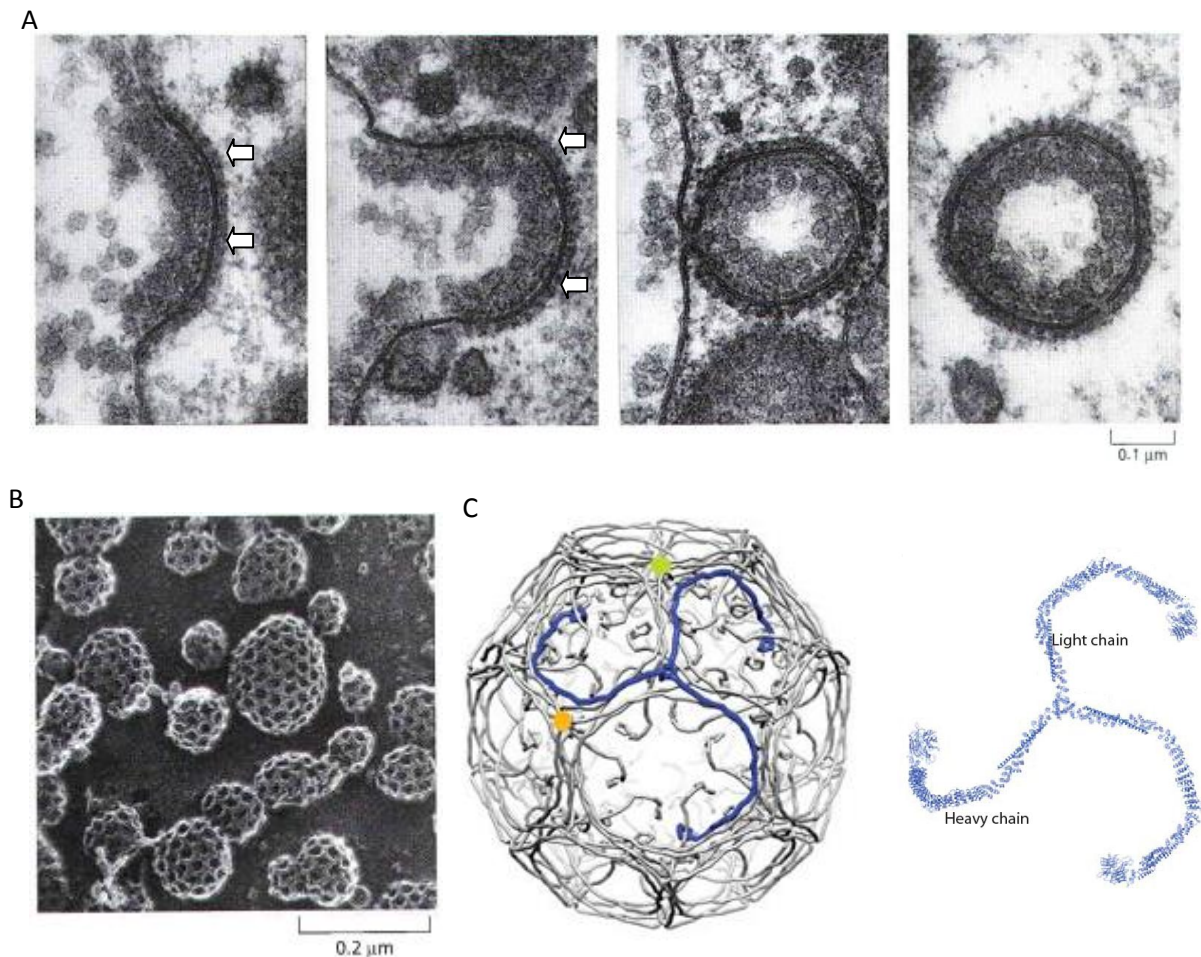


Figure 11 : Formation d'une vésicule recouverte de clathrine et structure du manteau de clathrine

A) Différentes étapes de la formation d'une vésicule recouverte de clathrine observé au microscope électronique à transmission. Le manteau de clathrine est visible sur la partie de membrane invaginée puis sur la vésicule d'endocytose. Adapté de Perry and Gilbert., 1979

B) Puits et vésicules recouvertes de clathrine observés au microscope électronique sur un échantillon préparé par la technique de cryo-fracture. La cage de clathrine, très régulière est parfaitement observable. Adapté de Heuser et al., 1980

C) Structure de la cage de clathrine sur laquelle on peut voir les tryskeles assemblés. En bleu et à droite : un tryskèle, avec les 3 chaînes légères au centre et les 3 chaînes lourdes en périphérie. Adapté de Xing et al., 2010

1.3.2 Formation/maturation de la vésicule

Bien que les mécanismes de formation des vésicules à clathrine soient bien décrits, certaines étapes de ce processus restent incomprises, dont l'initiation de la formation des puits. L'adaptateur AP2 a longtemps été considéré comme responsable de ce phénomène. Cependant, même si le complexe AP2 joue un rôle central dans la formation des vésicules à clathrine, son affinité pour la membrane plasmique via le PIP2 et les récepteurs, est relativement faible par rapport aux caractéristiques attendues pour initier la formation des puits. De plus, la polymérisation de la clathrine ne suffit pas pour induire la courbure de la

membrane plasmique (Boucrot et al., 2011). Il a donc été proposé que d'autres protéines portant des domaines capables de déformer la membrane plasmique telles que les protéines à domaine ENTH, domaine ANTH ou encore domaine BAR participent à l'initiation des puits à clathrine (Doherty & McMahon, 2009). Cependant, il est apparu que la plupart de ces protéines ont un rôle plutôt tardif, au moment où les puits à clathrine deviennent des vésicules.

Les protéines à domaine F-BAR FCHO ont quant à elles été associées à l'étape précoce de formation des vésicules à clathrine. Ces protéines ont en effet été détectées en microscopie électronique et en vidéo-microscopie à la membrane plasmique avant que la clathrine et AP2 y soient présentes (Henne et al., 2010 ; Reider et al., 2009) alors qu'elles ne sont plus détectées au niveau de la vésicule après la constriction du cou (Henne et al., 2010) (Figure 12c). De plus, l'inhibition de l'expression des protéines FCHO est associée à une diminution du nombre de puits à clathrine présents à la membrane plasmique (Henne et al., 2010) ainsi qu'à une inhibition de l'internalisation de certains récepteurs comme le TfR ou l'EGFR. Inversement, la surexpression des FCHO induit une augmentation du nombre de puits et de vésicules à clathrine. L'implication de ces protéines a ainsi permis d'ajouter une étape en amont dans le modèle classique de formation des puits de clathrine (Figure 10). Le domaine F-BAR des protéines FCHO joue un rôle crucial pour leurs fonctions dans la CME, puisque des mutations de ce domaine suffisent à abolir la capacité des protéines FCHO à induire la courbure initiale nécessaire à la formation des puits à clathrine (Henne et al., 2010 ; Reider et al., 2009).

Plusieurs autres protéines à domaines BAR telles que l'amphiphysine, SNX9 (Sorting Nexin 9), FBP17 (Formin Binding Protein 17), l'endophiline et l'epsine sont impliquées dans la formation des vésicules à clathrine et ont la capacité d'induire une courbure de la membrane (Ford et al., 2002 ; Peter et al., 2004 ; Shimada et al., 2007 ; Frost et al., 2009). Cependant, toutes ces protéines ont un rôle plus tardif que les FCHO et n'induisent pas l'initiation des puits à clathrine.

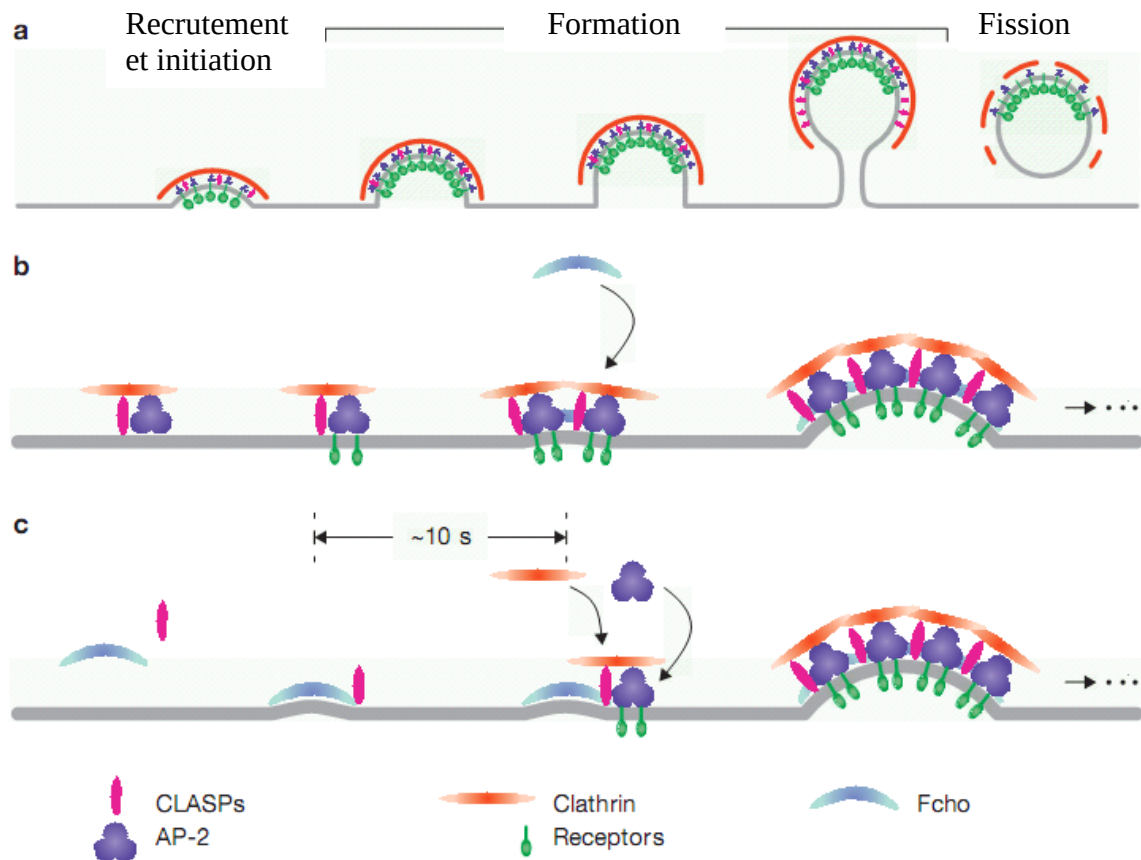


Figure 12 : Modèles de formation des vésicules à clathrine

A) Représentation schématique des différentes étapes de formation d'une vésicule à clathrine; le recrutement et initiation, la formation et la fission de la vésicule.
 B) Modèle de formation dans lequel les CLASPs (clathrin-coat-associated sorting proteins), AP-2 et la clathrine sont recrutés précocément et permettent la nucléation du puit. Les Fcho sont ici recrutés plus tard pour favoriser l'invagination de la vésicule.
 C) Modèle de formation dans lequel les Fcho et les CLASPs sont recrutés les premiers et entraînent la l'initiation du puit. AP-2 et la clathrine entrent en jeu plus tardivement. Adapté de Merrifield 2012

Récemment, une étude de la formation du puits à clathrine utilisant une technique de vidéo microscopie temporellement plus résolutive a cependant contredit l'intervention précoce des Fcho. En effet, cette étude a montré que les Fcho n'étaient recrutées à la membrane plasmique qu'une fois le manteau de clathrine assemblé (Cocucci et al., 2012). Pour les auteurs de cette étude, les Fcho permettraient donc la stabilisation du manteau de clathrine et préviendraient sa dislocation. Plusieurs modèles sont donc proposés pour le mécanisme de formation des vésicules à clathrine (Figure 12). Cet exemple souligne bien la difficulté

d'étudier finement la cinétique des déformations membranaires, car les acteurs impliqués sont souvent nombreux et leur action très transitoire.

1.3.3 Fission de la vésicule

Afin que la vésicule d'endocytose, en cours de formation, s'individualise de la membrane plasmique, un phénomène de fission membranaire doit avoir lieu. Pour cela, il faut que les deux feuillettes internes de la membrane au niveau du cou de la vésicule soit suffisamment proche pour fusionner. Afin de rapprocher les bicouches lipidiques et entraîner la fission, différentes protéines vont intervenir.

Dans le cadre de la CME, la séparation de la vésicule néoformée de la membrane plasmique est assurée par l'action de la dynamine (Marks et al, 2001). La dynamine est une GTPase qui, en présence de GTP, polymérise sous forme d'hélice, ce qui a pour effet de rapprocher et d'entraîner la fusion des lipides au niveau du cou de la vésicule permettant ainsi son individualisation (Daumke et al., 2014) (Figure 13). *In cellulo*, la dynamine interagit avec le PIP2 via son domaine PH (Pleckstrin Homology) (Takei et al, 1995). Il a été mis en évidence que l'inhibition de l'activité d'hydrolyse du GTP de la dynamine empêche la vésicule d'endocytose d'être internalisée et la bloque dans une étape où le cou de la vésicule reste large (Kirchhausen et al, 2008). Néanmoins, la dynamine semble favoriser la fission de la vésicule plutôt que l'induire à elle seule (Morlot et al, 2012; Pucadyil & Schmid, 2008). En

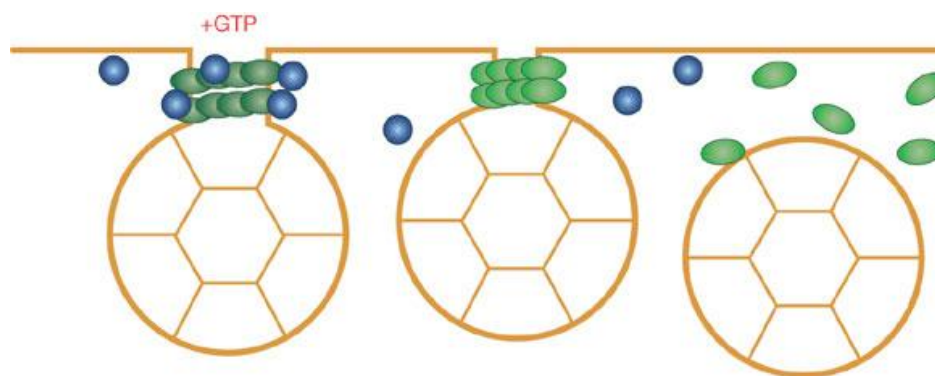


Figure 13: Fission de la vésicule de clathrine par la dynamine

En présence de GTP (bleu), la dynamine-GTP (vert foncé) polymérise sous forme d'hélice au niveau du cou de la vésicule et induit sa fission. Lorsque le GTP est hydrolysé en GDP, la dynamine (vert clair) se dépolymérise. Adapté de Hinshaw et al., 2006

effet, l'augmentation de la tension de ligne au niveau du cou de la vésicule semble également être un élément important pour permettre la fission de la vésicule (Roux et al., 2005 ; Liu et al., 2009 ; Romer et al., 2010). Le second rôle de la dynamine est justement de recruter des

facteurs capable d'augmenter la tension, comme des protéines à domaine BAR (Schafer et al., 2004 ; Evergren et al., 2007 ; Zhang et al., 2012, Daumcke et al., 2014) ou la cortactine, qui permet la polymérisation de l'actine au niveau du cou de la vésicule (Mc Niven et al., 2000).

Une fois la vésicule formée, le manteau de clathrine est rapidement désassemblé grâce à l'action de l'ATPase Hsc70, recrutée par l'auxiline (massol et al., 2006). Les composants du manteau de clathrine sont alors disponibles pour la formation d'une nouvelle vésicule.

1.3.4 L'actine dans la CME

De nombreuses protéines impliquées dans la CME sont des régulateurs de la polymérisation de l'actine (Mooren et al., 2012). Cependant, dans les cellules de mammifères, l'actine ne serait pas toujours indispensable pour le fonctionnement de la CME. Cette implication de l'actine dans la CME serait fonction de la tension de la membrane plasmique et donc du type cellulaire et de son environnement (Boulant et al., 2011). Lors de son implication dans la CME, l'actine semble participer à trois étapes de l'endocytose ; la formation de la vésicule à proprement parler, la fission de la vésicule et enfin le transport de cette dernière jusqu'aux compartiments endocytaires (Figure 14). Ainsi, il a été montré que l'inhibition de la polymérisation de l'actine, par la latrunculine A, bloque la formation des vésicules au stade où elles ont une forme en U (Mooren et al., 2012), suggérant un rôle de constriction de l'actine pour former le cou de la vésicule (Boulant et al., 2011 ; Collins et al., 2011). De plus, l'actine permettrait la stabilisation de la vésicule en interagissant notamment avec les protéines Hip1 et Hip1R (McPherson, 2002). En ce qui concerne la fission de la vésicule, des facteurs favorisant la polymérisation de l'actine (N-WASP, la cortactine et Arp2/3) seraient recrutés notamment par la dynamine, au niveau du cou de la vésicule, et permettraient d'augmenter la tension favorisant ainsi la fission (Boulant et al., 2011 ; Taylor et al., 2012).

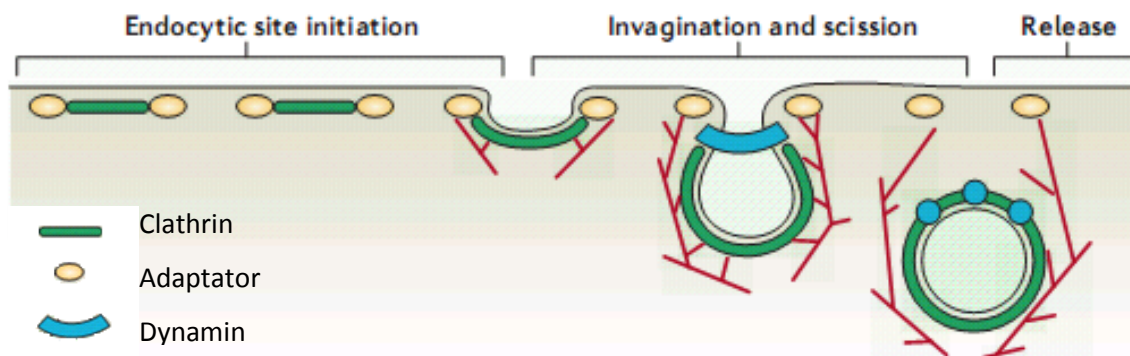


Figure 14 : L'actine facilite la formation, la fission et le déplacement des vésicules recouvertes de clathrine

L'actine (en rouge) semble participer dans certaines conditions à la formation, la stabilisation et la fission de la vésicule de clathrine. Elle pousse ensuite la vésicule jusqu'aux endosomes. Adapté de Kaksonen et al., 2006

1.4 Voies d'endocytose indépendantes de la clathrine (CIE)

Jusqu'à la moitié des années 1990, l'existence de voies d'endocytose ne faisant pas intervenir la clathrine restait controversée. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'outils génétiques visant spécifiquement des acteurs de la CME ont définitivement prouvé l'existence d'une voie indépendante de la clathrine (Lamaze and Schmidt, 1995). Au début des années 2000, les premiers cargos (IL2R, GPI-AP, CTxB) internalisés par des voies indépendantes de la clathrine furent identifiés (Lamaze et al., 2001 ; Nichols et al., 2001 ; Torgersen et al., 2001). Depuis ces travaux, plusieurs CIE distinctes ont été décrites et les mécanismes moléculaires associés à ces voies d'endocytose commencent à être compris. Comme je l'ai mentionné, il existe différentes voies CIE, chacune possédant ses régulateurs propres, mais le cytosquelette d'actine ainsi que les microdomaines lipidiques membranaires, riches en cholestérol (radeaux lipidiques), semblent être des éléments de régulation communs à toutes les CIE.

Un modèle d'étude important pour l'endocytose est la cellule neuronale. En effet, l'endocytose est continuellement sollicitée au niveau de la terminaison pré-synaptique, notamment, pour renouveler le pool de vésicules de neurotransmetteurs. C'est aussi dans ce modèle qu'il a été montré que la CME, seule, ne suffirait pas pour la cinétique de production de toutes les vésicules de neurotransmetteurs observables dans la terminaison présynaptique. En effet, une vésicule d'endocytose met environ 20 secondes à être formée par la clathrine et sa machinerie. Hors, une étude a mis en évidence, en utilisant l'optogénétique et la microscopie électronique, que seulement 100 ms après la fusion des vésicules aux neurotransmetteurs avec la membrane, de nouvelles vésicules pouvaient être générées au bord de la zone active. Ces vésicules, qui permettent de retirer rapidement l'apport de membrane résultant de la fusion des vésicules aux neurotransmetteurs, ne sont pas recouvertes de clathrine et suggèrent donc l'importance de la CIE dans un compartiment aussi spécialisé que la terminaison pré-synaptique (Watanabe et al., 2013) (Figure 15).

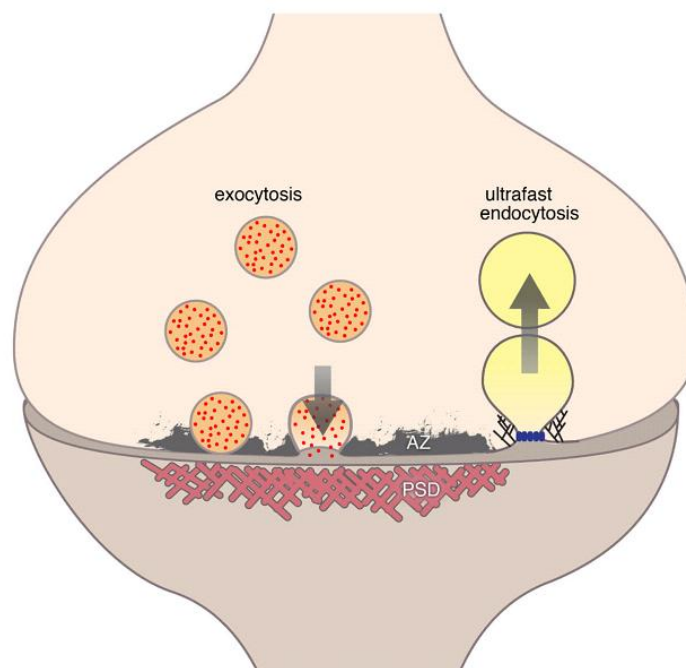


Figure 15 : La CIE ultrarapide permet de réguler la surface de la membrane présynaptique après fusion des vésicules aux neurotransmetteurs.

Un potentiel d'action entraîne la fusion de vésicules aux neurotransmetteurs avec la membrane présynaptique (AZ : Active Zone). L'apport de membrane résultant de ces fusions est alors rapidement compensé par une CIE dépendante de l'actine et de la dynamine. Adapté de Watanabe et al., 2013

1.4.1 Rôle des lipides dans la CIE

La présence de sphingolipides (SL), de cholestérol et de protéines sur le feuillet externe de la membrane plasmique est nécessaire à la formation des DRM (Detergent Resistant Membrane), aussi appelés radeaux lipidiques, qui forment des plateformes de recrutement pour de nombreux acteurs de la CIE (Lingwood and simons, 2010).

Les SLs sont composés d'une sphingosine liée à une chaîne d'acide gras et les différents types de tête présentes sur la molécule divise les SLs en 3 principales classes: les céramides, les sphingomyélines et les GSL (qui sont composés pour moitié d'un sucre et qui peuvent être sous divisés en cérébrosides ou en gangliosides selon le type de glycosylation). Les larges têtes des SL entraînent des espaces qui sont comblés par des molécules de cholestérol, qui interagissent fortement avec les SL et peuvent créer une communication de part et d'autre de la bicouche. Les domaines transmembranaires des protéines peuvent lier fortement les lipides (Nyholm et al., 2007) et créer et stabiliser des microdomaines lipidiques. Le regroupement de lipides et de protéines, par l'ajout de ligands multivalents comme des anticorps ou des toxines bactériennes, entraîne également la création et la stabilisation de tels microdomaines essentiels au processus d'internalisation (Figure 16). Une fois créés, les microdomaines et leur cargos associés vont être regroupés, de façon passive, au sein de domaines de taille plus importante (Johannes et al., 2010) (Figure 16). Ce phénomène a pour but de diminuer le coût énergétique et entraîne la création d'asymétries locales qui se traduisent par une courbure négative de la membrane plasmique. L'accumulation de cargos dans les microdomaines peut aussi être active, comme pour les GPI-AP, rassemblés par l'action du cytosquelette d'actine corticale (Goswami et al., 2008) et stabilisé par le cholestérol (Suzuki et al., 2012). L'invagination des microdomaines permet de réduire l'énergie due au phénomène de tension de ligne (Sarasij et al., 2007).

Les lipides qui composent les radeaux lipidiques et plus particulièrement les SL et le cholestérol sont donc essentiels à l'étape d'internalisation dans la CIE. En effet, la perturbation de la distribution du cholestérol par certaines drogues (filipine, nystatine..) a un effet inhibiteur sur toutes les CIE (Doherty and McMahon, 2009). Le cholestérol, en se concentrant, au niveau des radeaux lipidiques, sur le feuillet externe de la membrane, diminue la rigidité de la membrane et facilite la courbure membranaire. De plus, les radeaux lipidiques forment de véritables plateformes de recrutements pour les acteurs de l'endocytose (Doherty et McMahon., 2009).

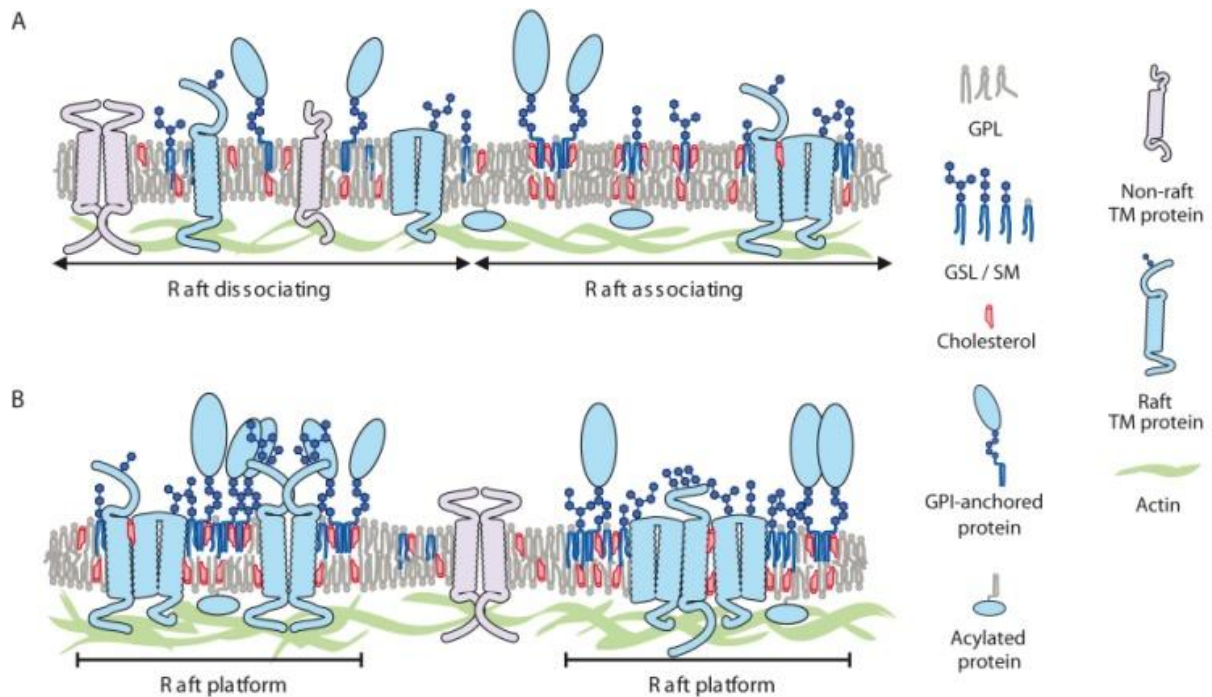


Figure 16 : Les radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques, composés principalement de sphingolipides (GSL, SM) et de cholestérol peuvent passer d'un état dissocié (A, gauche) à un état associé (A, droite). La liaison de ligands sur les GPI-AP, les GSL ou des récepteurs transmembranaires (TM) associés aux radeaux, peuvent induire la formation de domaine qui forment des plateformes de recrutement pour les acteurs de l'endocytose (B). Adapté de Lingwood and Simons, 2010

Les DRM sont des domaines enrichis en GPI-AP, flotillines, caveolin 1 ou encore, en protéines G (Casey, 1995), molécules qui ont toutes été impliquées dans la CIE. Certains glycosphingolipides, tels que GM1 (monosialotetrahexosylganglioside) ou Gb3 (globotriaosylceramide), qui sont respectivement les cibles de la toxine cholérique (CTxB) et la toxine de shiga (STxB), jouent un rôle primordial pour l'internalisation. Comme nous l'avons déjà vu, la liaison de ces toxines permet le rassemblement des lipides en microdomaines, ce qui déforme la membrane plasmique et induit leur internalisation (Johannes et al., 2014).

Dans la phagocytose, le PI4,5P2 joue un rôle de recruteur de facteurs de polymérisation de l'actine. En effet, une augmentation rapide de la présence de PIP2 au niveau du phagosome en formation permet le recrutement de N-WASP (Coppolino et al., 2002). Le PIP2, une fois converti en PIP3 par la PI3K, recrute Rac1 et le complexe WAVE à la base du phagosome (Marshall et al., 2001). Le PIP2 a été également récemment impliqué dans la voie CIE médiée par les endophilines (FEME). Dans ce contexte, le PIP2 jouerait un rôle important dans le

recrutement, via la lamellipodine, des endophilines à la membrane plasmique (Boucrot et al., 2014).

1.4.2 Rôle de l'actine dans les CIE

Le cytosquelette d'actine a été impliqué dans de nombreuses voies d'endocytose. Bien que chez la levure, l'actine soit indispensable pour plusieurs étapes de la formation des vésicules à clathrine, chez les mammifères, l'actine semble plus importante dans le cadre des CIE. En effet, de nombreuses protéines contrôlant les CIE sont des régulateurs de la polymérisation de l'actine. Dans cette partie, je décrirai rapidement le fonctionnement de l'actine et de sa machinerie moléculaire ainsi que son rôle dans les CIE.

1.4.2.1 Fonctionnement de l'actine et de sa machinerie

Le filament d'actine, également nommé F-actine, est un polymère d'actine à structure asymétrique. Son extrémité (+) nommée « barbed end » est composée d'actine associée à l'ATP, tandis qu'à son extrémité (-) nommée « pointed end », l'ATP a été hydrolysée en ADP (Dominguez & Holmes, 2011). L'initiation d'un filament d'actine est défavorable thermodynamiquement, les dimères et trimères formés spontanément dans la cellule étant très instables. De plus l'actine monomérique peut être séquestrée en s'associant à des protéines comme la profiline ou T β 4 (thymosine- β -4), empêchant ainsi l'association des monomères d'actine en filament. La présence de protéines permettant l'initiation (Arp2/3) puis l'élongation des filaments d'actine (NPF) est donc nécessaire (Figure 17A). Dans la cellule, les filaments d'actine peuvent être longs et linéaires, ils sont alors de type câblé. Ils peuvent éventuellement être maintenus entre eux par des protéines comme les fascines formant ainsi des faisceaux d'actine (Edwards & Bryan., 1995). Les protéines de la famille des formines et de la famille EVH (ENA/VASP Homology protein) sont impliquées dans la polymérisation des filaments câblés. Les filaments d'actine peuvent également être de type branché, dans ce cas, la formation d'un nouveau filament d'actine s'effectue à partir d'un filament préexistant. Le complexe protéique Arp2/3 (Actin related protein 2/3) est indispensable à ce processus (Firat-Karalar & Welch, 2011). En effet, les sous unités Arp2 et Arp3 ont une structure similaire à l'actine et permettent ainsi, en présence d'ATP, de mimer un début de filament d'actine (Robinson et al., 2001). L'initiation d'un nouveau filament d'actine va pouvoir se faire avec un angle de 70° par rapport au premier (Pollard., 2007) (Figure 17B). Le rendement de cette initiation est augmenté par les NPF (Nucleating Promoting Factor) de type 1 tels que

les complexes N-WASP et WAVE ou de type 2 tels que la cortactine ou HS1 (Haematopoietic lineage cell-Specific gene protein 1).

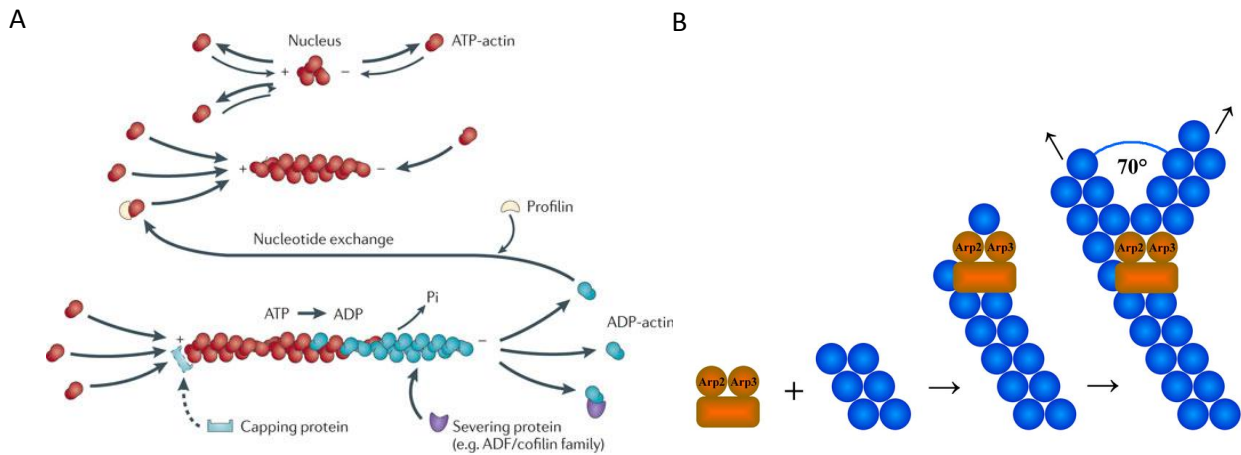


Figure 17 : Schémas de la polymérisation de l'actine et du rôle d'Arp2/3 dans la polymérisation de l'actine branchée

A) L'association d'actine-ATP est beaucoup plus rapide au bout + du polymères. L'hydrolyse de l'ATP en ADP va induire le recrutement, du côté – du filament d'actine, de facteurs qui vont favoriser la dépolymérisation de l'actine (cofiline). La profiline va pouvoir s'associer aux monomères d'actine-ADP, les séquestrer et favoriser l'échange de nucléotides pour former de l'actine-ATP. Adapté de Nurnberg et al, 2011

B) Le complexe Arp2/3 va mimer un nouveau brin d'actine, la polymérisation d'un nouveau filament va se faire avec un angle de 70° par rapport au premier. Adapté de Splettstoesser 2006

Les NPF de type 1 possèdent un domaine WH2 (Wiskott-Aldrich homology region 2) responsable de la liaison à l'actine monomérique ainsi qu'un domaine WCA (WH2, Connector region, Acidic region) qui leur permet de lier Arp2/3. Le rapprochement par les NPF de Arp2/3, liés au brin d'actine mère, avec les monomères d'actine facilite la nucléation du filament d'actine branché. Bien qu'il existe d'autres NPF1, je ne parlerai ici que de WAVE et N-WASP qui ont un rôle important au niveau de la membrane plasmique. Ces protéines doivent être activées pour que le domaine WH2 soit démasqué (Derivery et al., 2009; Miki et al, 1998). L'activation de N-WASP s'effectue par interaction compétitive de Cdc42 (Cell division control protein 42 homolog) ou de Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) sur le domaine CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) de N-WASP qui est impliqué dans la séquestration du domaine WH2 (Figure 18). Cdc42 et Rac1 sont donc des activateurs de la

polymérisation de l'actine. En ce qui concerne le complexe WAVE, il est activé par Rac1 qui, de la même manière que pour N-WASP, permet au domaine WH2 d'être exposé. Bien que N-WASP et WAVE aient un mécanisme d'activation similaire lors de la polymérisation d'actine branchée, ils ont été impliqués dans des mécanismes d'endocytose différents.

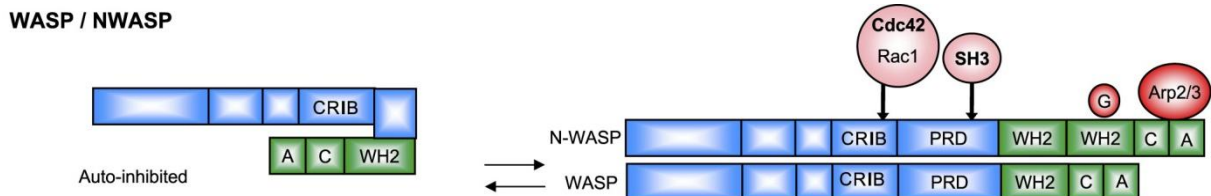


Figure 18 : Exemple d'une NPF de type 1 (N-WASP) et son mécanisme d'activation

Les NPF de type 1, comme N-WASP, sont intrinsèquement inactifs, le domaine WH2 étant masqué. L'interaction de Cdc42 ou de Rac1 sur le domaine CRIB libère le domaine WCA qui peut interagir avec un monomère d'actine (représenté par le rond rouge rempli d'un G) et le complexe Arp2/3; permettant la polymérisation d'actine branchée. Adapté de Le Clainche & Carlier, 2008

Les NPF de type 2, ont une activité d'initiation du filament d'actine bien plus faible que celle des NPF de type 1. Les seuls NPF de type 2 connus sont la cortactine et son homologue HS1 dans les cellules hématopoïétiques. Cette protéine permettrait de stabiliser le complexe Arp2/3 associé au filament d'actine (Weaver et al, 2002) et agit en synergie avec N-WASP sur la polymérisation de l'actine, puisque la cortactine peut, grâce à un domaine SH3, interagir avec ce complexe (Weaver et al, 2002).

1.4.2.2 Implication de l'actine et sa machinerie dans les CIE

Les plateformes formées par l'actine et la machinerie qui régule sa polymérisation semblent importantes dans toutes les CIE. Ainsi, la perturbation de la dynamique de l'actine par des inhibiteurs qui bloquent sa polymérisation ou sa dépolymérisation inhibent la formation des CLIC (Clathrin Independent Carrier) dans la plupart de ces voies. Il a été montré récemment que la réorganisation de l'actine est nécessaire pour la scission de tubes lipidiques formés *in-vitro* (Romer et al., 2010). Les travaux sur le rôle de l'actine dans l'endocytose sont plus faciles à mener *in vitro* puisque dans la cellule, l'actine est aussi impliquée dans l'assemblage des lipides et des protéines (Gowrishankar et al., 2012). L'actine et sa machinerie peuvent être recrutés et activés de différentes façons selon les voies d'endocytose et les cargos internalisés. Cette activation peut impliquer le recrutement de régulateurs de la polymérisation de l'actine

comme Cdc42 pour la voie CLIC/GEEC (GC), RhoA pour la voie IL2R ou Rac1 pour le récepteur nicotinique par exemple (Kumari et al., 2008). L'actine serait impliquée aussi bien dans la déformation de la membrane plasmique lors de l'endocytose de cargos CIE que dans la fission des vésicules portant ces cargos (Doherty and McMahon., 2009).

1.4.3 CIE à petite échelle

1.4.3.1 Les cavéoles

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique, décrites pour la première fois en 1955 (Pallade et al., 1953) et plus ou moins présentes selon le type cellulaire. Ces invaginations possèdent une forme ovoïde et une taille (60 à 90 nm) caractéristiques, permettant de les différencier aisément, en microscopie électronique, des puits à clathrine. De plus, le côté intracellulaire de la membrane des caveoles apparaît dépourvu de manteau protéique. La formation de ces invaginations a lieu au niveau des radeaux lipidiques et les cavéolines sont les protéines clé de la formation des cavéoles et sont de ce fait, utilisées comme marqueurs moléculaires de ces structures.

La formation des vésicules issues des cavéoles nécessite différentes protéines telles que la cavéoline et les cavines et plus particulièrement la cavine 1 (Hill et al, 2008) sans que le mécanisme soit vraiment connu. Des oligomères de cavéolines, formés au niveau de l'appareil de Golgi, sont adressés à la membrane plasmique qui, après le recrutement et la formation d'un complexe composé des cavines 1, 2, 3 et 4, forment les cavéoles (Figure 19). Il existe 3 isoformes de la cavéoline ; Cav- 1, 2 et 3, qui possèdent toutes une boucle hydrophobe permettant leur insertion dans des domaines membranaires riches en cholestérol. La déplétion en Cav-1 et Cav-3 induit la perte des cavéoles à la membrane plasmique (Drab et al., 2001) alors que la déplétion de la Cav-2 ne l'induit pas. La Cav-3 est presque exclusivement retrouvée dans le muscle squelettique strié alors que la Cav-1 est quand à elle ubiquitaire. La simple expression de Cav-1 dans des cellules ne présentant pas de cavéoles est suffisante pour induire leur apparition. La protéine à domaine BAR PACSIN 2 (PKC and Casein kinase Substrate In Neurons 2) a été impliquée dans la formation des cavéoles en facilitant la courbure de la membrane (Hansen et al, 2011). De plus, la PACSIN 2 permet le recrutement de la protéine EHD2 (Eps-15 homology domain-containing protein 2) qui est à l'origine du lien entre la vésicule d'endocytose et le cytosquelette d'actine, stabilisant les mouvements latéraux de la vésicule (Stoeber et al, 2012). Il a été rapporté qu'en absence d'EHD2,

l'endocytose dépendante des cavéoles est augmentée (Stoeber et al., 2012). Dans la voie dépendante des cavéoles la fonction de l'actine est controversée. La dépolymérisation de l'actine semble à la fois inhiber l'entrée de certains cargos (Parton et al, 1994) et augmenter l'entrée d'autres cargos (Shen & Turner, 2005). Ce double effet pourrait être une conséquence de la dissociation du réseau de cavéoles impliqué dans la tension de la membrane et qui est maintenu par les filaments d'actine (Lajoie & Nabi, 2010).

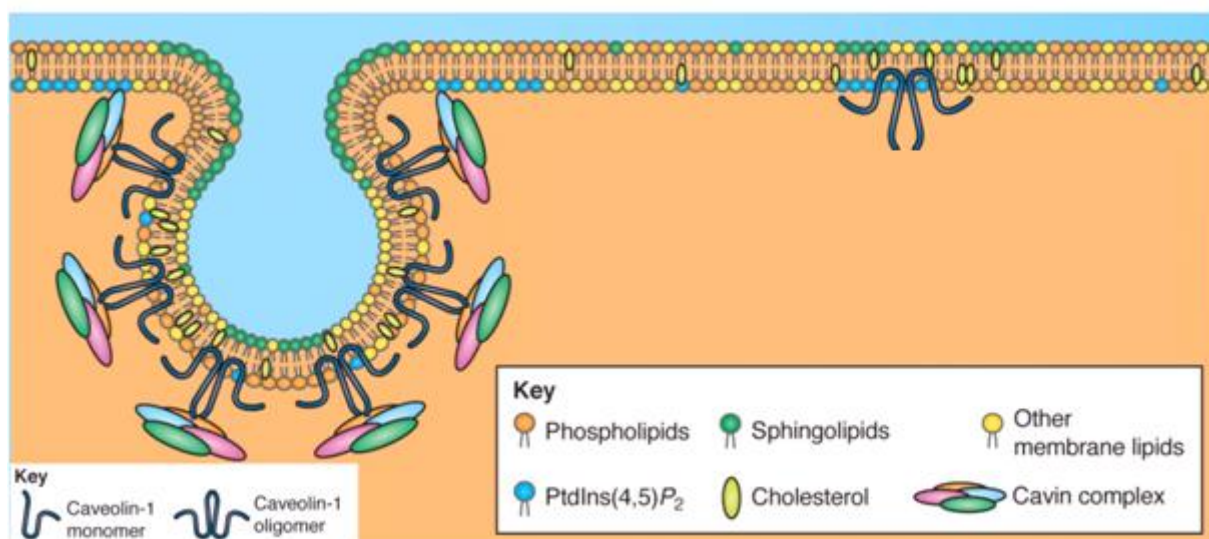


Figure 19 : Acteurs moléculaires impliqués dans la formation des cavéoles

Les cavéoles se forment dans des domaines riches en phospholipides, sphingolipides et cholestérol. Les oligomères de Cav-1 et le complexe formé par les cavins ont un rôle crucial pour la formation et le maintien des cavéoles. Adapté de Bastiani et Parton 2010

L'étude de la voie des cavéoles a été difficile du fait de l'absence de cargo spécifique de cette voie d'endocytose. Il a cependant été montré que le récepteur CD59 ainsi que la CTxB et la STxB sont partiellement internalisés par ce mécanisme (Parton & del Pozo, 2013). En effet, la Cav-1 peut lier les acides gras de glycosphingolipides tels que GM1 et Gb3 (Fra et al., 1995) dont les ligands sont respectivement CTxB et STxB. Ces protéines, CTxB et STxB, sont donc utilisées comme marqueur de cette voie d'endocytose.

La scission de la vésicule issue des cavéoles est assurée par la dynamine, potentiellement recrutée au site de fission par l'intersectine (Oh et al, 1998; Predescu et al, 2007).

Les vésicules issues des cavéoles peuvent directement être recyclées à la membrane plasmique ou adressées aux endosomes précoces (Pelkmans & Zerial, 2005). Cette voie cavéolaire a aussi été impliquée dans la transcytose à travers la barrière endothéliale (Frank et

al, 2009), un processus qui permet à une substance ou une particule de traverser le cytoplasme d'une cellule.

Indépendamment de l'endocytose, les cavéoles ont un rôle de senseur mécanique en permettant, le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique notamment lors de stress mécaniques. Ainsi, en réponse à une tension exercée sur la membrane plasmique, une partie des cavéoles s'aplatissent afin de fournir un surplus de membrane et ainsi diminuer la tension (Dulhunty & Franzini-Armstrong, 1975; Sinha et al, 2011). Cette fonction est particulièrement importante dans les cellules musculaires.

Finalement, le rôle précis des cavéoles dans l'endocytose reste méconnu et d'autres études sont nécessaires afin de mieux connaître la fonction de ces structures.

1.4.3.2 La voie flotilline

Les vésicules d'endocytose issues de la voie flotilline sont morphologiquement semblables à celles issues de la voie des cavéoles. De plus, les structures tridimensionnelles prédites pour les flotillines sont similaires à celles prédites pour les cavéoline. Il existe deux isoformes de flotilline, les flotillines 1 et 2, qui semblent toutes deux indispensables à la formation des vésicules d'endocytose (Frick et al, 2007). Comme les cavéolines, les flotillines possèdent une boucle hydrophobe qui leur permettent de s'insérer dans des domaines membranaires riches en cholestérol (Glebov et al, 2006; Parton & del Pozo, 2013). Ces protéines semblent de plus capables d'induire des invaginations de la membrane plasmique lorsqu'elles sont surexprimées (Frick et al, 2007). Cependant, le mécanisme de formation des vésicules dépendantes des flotillines n'est pas encore connu (Mayor et al., 2014).

Les flotillines ont été impliquées dans l'internalisation de la phase fluide et de plusieurs protéines, comme CD59, qui se lie à une ancre GPI (GlycosylPhosphatidylinositol) (Ait-Slimane et al, 2009), des protéoglycanes (Payne et al, 2007) ou encore CTxB (Glebov et al., 2006), néanmoins aucun cargo réellement spécifique de cette voie d'entrée n'est connu. L'utilisation de la microscopie en TIRF (Total Internal Reflexion Fluorescence), a permis de montrer que les vésicules recouvertes de flotillines peuvent être détachées de la membrane plasmique, et donc internalisées (Glebov et al, 2006) mais que, comme pour les cavéoles, cet événement est rare par rapport aux vésicules à clathrine. Ces données suggèrent ainsi l'existence d'une voie d'endocytose dépendante de la flotilline, néanmoins, aucune étude ne montre l'entrée de vésicules de flotilline portant un cargo. Les vésicules de flotilline à la

membrane plasmique pourraient donc n'être qu'un site de stockage, de signalisation ou de maturation en vue de l'entrée des récepteurs par une autre voie d'endocytose. Cela semble être ainsi le cas pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). Cette protéine entre dans la cellule par CME (Cossec et al, 2010; Schneider et al, 2008), bien que la déplétion de la flotilline, par interférence à ARN (ARNi), inhibe l'entrée de l'APP. Le rôle de la flotilline serait donc de concentrer l'APP au niveau de la membrane plasmique en vue de son endocytose par CME (Schneider et al, 2008) (Figure 20).

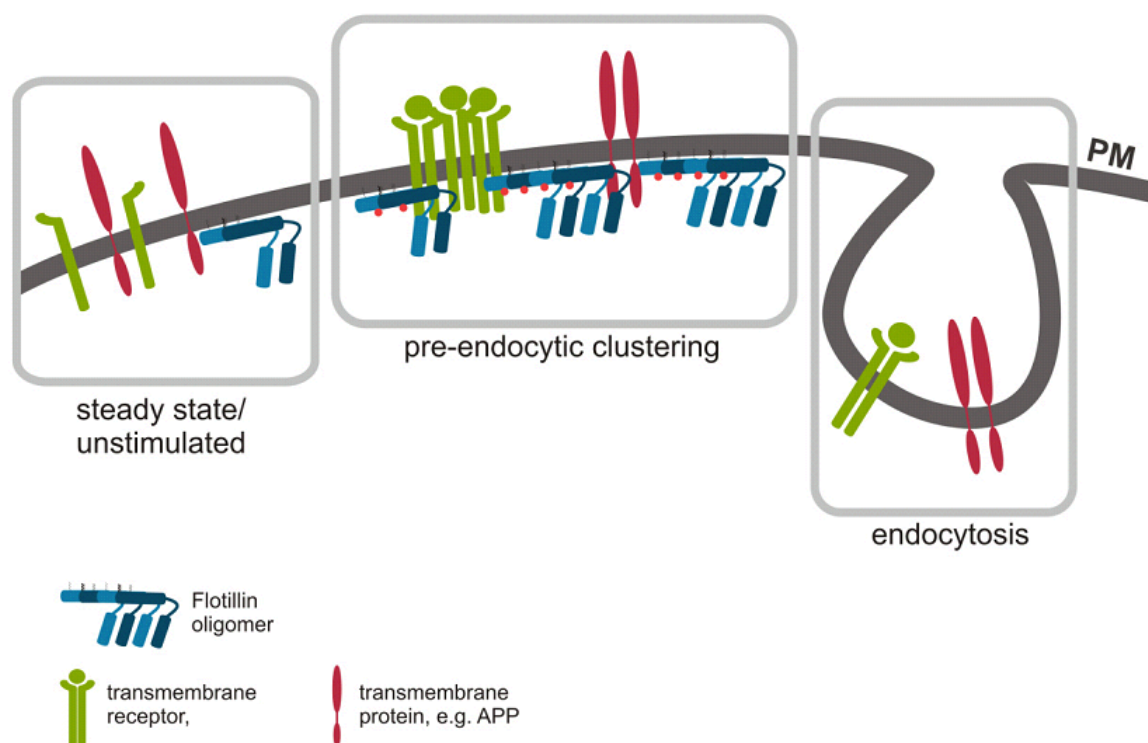


Figure 20 : Les oligomères de flotilline concentrent les cargos pour permettre leur endocytose

Les oligomères de flotilline regroupent les cargos stimulés, à la membrane plasmique. Les cargos peuvent ensuite être internalisés. Cependant, il n'a pas été montré que les vésicules individualisées portant ces cargos sont flotillines positives. Adapté de Meister and Tikkanen., 2014

1.4.3.3 La voie CLIC/GEEC

Cette voie d'endocytose est caractérisée par des protrusions membranaires en forme de tubules et non en forme de vésicules, comme il a été décrit pour les autres voies CIE. Les cargos internalisés par cette voie CLIC (CLathrin-Independent Carrier) se retrouvent dans un premier temps dans un compartiment distinct de l'endosome précoce appelé GPI Enriched Early Compartment (GEEC), d'où le nom de CG (CLIC-GEEC) pour cette CIE. Cette voie est impliquée dans l'endocytose des protéines à ancre GPI (GPI-AP) et ne présente, au niveau de l'invagination, aucun manteau ou matériel dense aux électrons (Kirkham et al., 2005). Si un manteau est en réalité présent, il est trop transitoire ou sensible aux agents de fixation pour

être observé. Le mécanisme d'enrichissement des CLIC en GPI-AP n'est pas bien compris mais, il a été montré qu'il dépend du cholestérol et des sphingolipides (GSL) (Sharma et al., 2004 ; Chadda et al., 2007). Il a été proposé que plutôt qu'un motif spécifique porté par le cargo, celui-ci serait adressé dans cette voie par des phénomènes d'encombrement stérique des protéines, et par l'affinité des ancres GPI pour les microdomaines riches en cholestérol (Bhagatji et al, 2009).

L'actine et ses régulateurs jouent un rôle crucial dans cette voie d'endocytose. En effet, l'initiation de la machinerie moléculaire de la voie CG se fait par le recrutement de GBF1 (Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1), un facteur d'échange de guanine (GEF) qui permet l'activation d'Arf1 (ADP ribsylation factor 1) (Gupta et al., 2009) qui peut ensuite recruter ARHGAP10 à la surface membranaire (Kumari et Mayor, 2008). ARHGAP10 permet alors le maintien de la RhoGTPase Cdc42 sous sa forme active et ainsi le recrutement de la machinerie de polymérisation de l'actine à la membrane plasmique. N-WASP semble également importante pour le fonctionnement de la voie CG (Chadda et al., 2007).

La protéine à domaine N-BAR, GRAF1 semble également être un élément important de cette voie CG puisqu'il a été montré que la déplétion de cette protéine entraîne une baisse de l'internalisation par la voie CG dans les cellules HeLa (Lundmark et al., 2008). L'initiation de la courbure membranaire des CLIC pourrait être due à cette protéine GRAF1 qui possède en plus du domaine BAR, un domaine SH3 (Src Homologie domain 3). GRAF1 serait ainsi responsable de la formation de tubules d'environ 40 nm de diamètre (Lundmark et al., 2008)

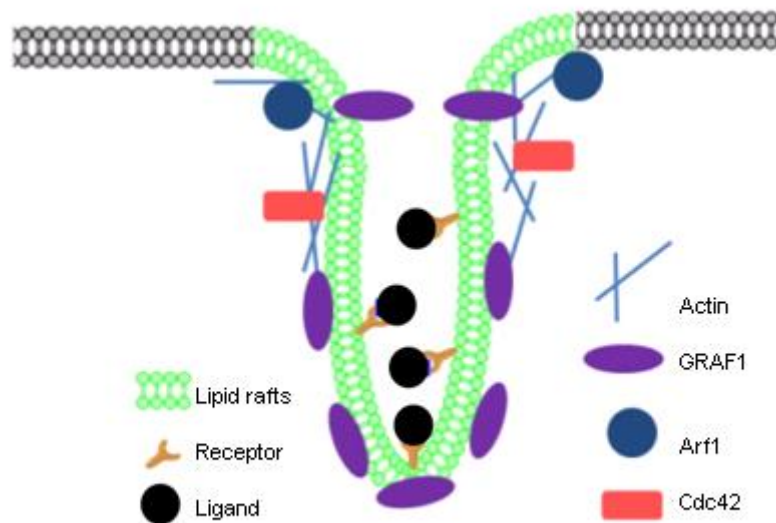


Figure 21 : Schéma représentant un tubule CG et les acteurs moléculaires impliqués dans sa formation

Dans la voie CG, l'invagination de la membrane plasmique a lieu au niveau de radeaux lipidiques. L'actine et des facteurs qui permettent sa polymérisation (Cdc42, Arf1) sont impliqués dans la formation de l'invagination, caractérisée par une morphologie tubulaire. La protéine à domaine N-BAR, GRAF1, est également nécessaire pour la formation du CLIC et permet de sculpter la membrane en tubule de 40 nm de diamètre. Adapté de Boisvert and Tijssen, 2012

(Figure 21). Les tubules sont ensuite adressés dans les GEEC, où les cargos pourront alors être triés vers différents compartiments membranaires comme les lysosomes ou vers un compartiment de recyclage perinucléaire (Fivaz et al, 2002; Sabharanjak et al, 2002).

Récemment, la Galectine 3, une protéine cytoplasmique mais aussi extra cellulaire, a été impliquée dans la formation d'une population de CLIC. La Galectine 3, fait partie des lectines, une famille de molécules qui lient fortement les carbohydrates (saccharides). La Galectine 3 extra cellulaire peut interagir sous forme de monomère avec les cargos N-glycosylés (comme CD44, $\beta 1$ integrin) ce qui lui donnerait la capacité d'oligomériser. Elle pourrait ensuite, sous cette forme oligomérisée, lier les GSL environnants, induire le regroupement des cargos et des GSL et ainsi déformer la membrane plasmique pour former des tubules (Lakshminarayan et al., 2014) (Figure 22).

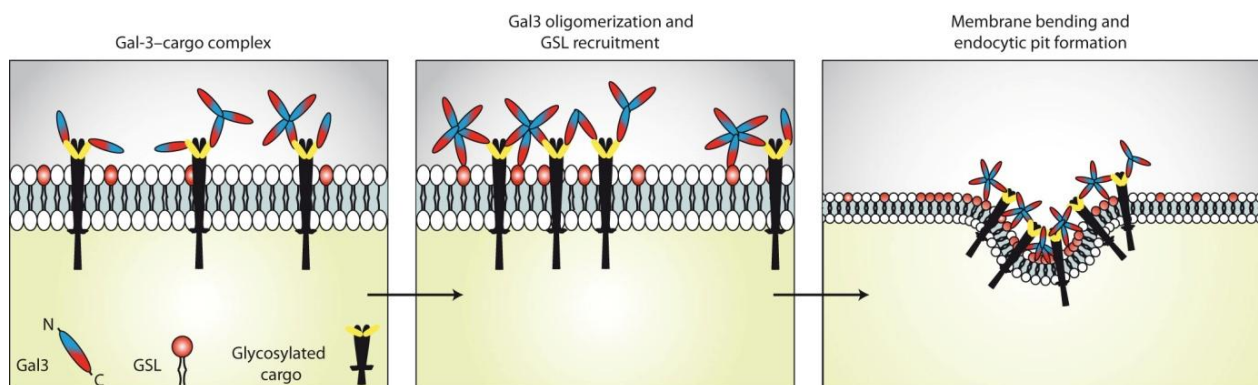


Figure 22 : Schéma représentant la formation d'un CLIC par la Galectine 3

La Galectine 3 extracellulaire interagit avec les cargos N-glycosylés par sa partie C-terminale, ce qui lui donne la capacité d'oligomériser via sa partie N-terminale. Sous cette forme oligomérisée, la Galectine 3 peut lier les GSL ce qui engendre une contrainte mécanique et déforme la membrane plasmique. Adapté de Lakshminarayan et al., 2014

La dynamine quant à elle, colocalise avec les GEEC et semble nécessaire pour le recyclage à la membrane plasmique (Kirkham et al., 2005) mais ne semble pas requise pour la fission lors de l'internalisation.

La voie CG a été impliquée, en plus des GPI-AP, dans l'endocytose d'une partie de la phase fluide (Sabharanjak et al., 2002) de façon distincte de la macropinocytose puisque insensible à l'amiloride, un inhibiteur spécifique de la macropinocytose. En plus de ces cargos, plusieurs protéines transmembranaires tels que CD44, la dysferline, le récepteur au folate ou la CTxB sont partiellement endocytés par la voie CG (Kirkham et al., 2005) (Howes et al., 2010).

La nature constitutive de la voie CG, sa cinétique ainsi que le fait qu'elle prenne en charge de grands volumes de membrane, en font un bon candidat pour contribuer significativement au renouvellement de la membrane plasmique, afin de réguler la surface cellulaire et, de ce fait, la tension membranaire (Mayor et al., 2014). D'ailleurs une étude a montré que le recyclage de compartiments GEEC vers la membrane plasmique est stimulé lorsque la tension membranaire est augmentée (Gauthier et al., 2009).

Récemment, il a été montré que les cavéolines 1 et 3 ainsi que les cavines 1 et 3, des protéines contrôlant spécifiquement la voie des cavéoles, agissent de façon négative sur la voie CG (Chaudhary et al., 2014). En effet, l'expression de ces protéines inhibe l'activité de la voie CG alors que leur déplétion l'augmente. De plus, la cavine 1 non cavéolaire agirait comme un régulateur de l'activité de Cdc42. Cette étude démontre encore une fois que la spécificité moléculaire des différentes voies est difficile à définir et que les différentes CIE ont la capacité de se compenser (Chaudhary et al., 2014), rendant leur étude plus complexe.

1.4.3.4 La voie Arf6

Les protéines de la famille Arf, des protéines liant le GTP, sont connues pour contrôler différentes fonctions cellulaires et notamment plusieurs étapes du trafic endocytaire (Donaldson and Jackson, 2011). Arf6 (ADP ribosylation factor 6) a été impliquée dans la CME en favorisant notamment la production d'acide phosphatidique et de PI4,5P2 (Caumont et al., 1998 ; Krauss et al., 2003). L'implication d'Arf6 dans l'endocytose semble en grande partie due à son action sur la phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (Grant et Donaldson., 2009), une enzyme qui synthétise le PI4,5P2. Ainsi, il a été montré qu'Arf6 contrôle l'endocytose mais aussi le recyclage de plusieurs récepteurs tels que la TfR, l'intégrine $\beta 1$, des récepteurs couplés aux protéines G ou encore l'E-cadhérine (Prigent et al., 2003 ; Brown et al., 2001 ; Altschuler et al., 1999 ; Schweitzer et al., 2010). Récemment, il a été montré que EFA6 (Exchange Factor for Arf6), un facteur d'échange pour Arf6, a la capacité de recruter les endophilines à la membrane plasmique. Une fois recrutées, les endophilines coopèrent avec EFA6 pour activer Arf6 et contrôlent de ce fait, la CME et notamment l'internalisation de la transferrine (Boulakirba et al., 2014). En plus de ce rôle d'Arf6 dans la CME, cette protéine a également été impliquée dans la CIE.

La CIE médiée par Arf6 est peu caractérisée et la morphologie du compartiment dans lequel est internalisé le matériel n'est pas décrite (Blouin et al., 2013). Cette protéine est présente dans beaucoup de types cellulaires, sur des endosomes qui contiennent des cargos endocytés par CIE. En effet, il a par exemple été montré que les protéines CD59 et MHCI peuvent se retrouver dans des endosomes positifs pour Arf6 et distincts des structures endocytaires de la voie CG (Naslavki et al., 2004 ; Lundmark et al., 2008). Depuis sa découverte (Radha-krishna and Donaldson., 1997) des études ont montré que de nombreuses protéines pourraient être endocytées par cette voie Arf6. C'est ainsi le cas de récepteurs impliqués dans le transport de nutriments (Glut1, CD98), dans l'interaction avec la matrice (CD44, CD147), dans les fonctions immunitaires (MHC de classe 1, CD1a) ou même de certaines protéines à ancre GPI (CD55, CD59) (Eyster et al., 2009 ; Maldonado-Baez et al., 2013). Cette voie dépendante d'Arf6 est très proche de la voie CLIC/GEEC puisqu'elle permet l'internalisation de cargos similaires (Howes et al., 2010). La voie Arf6 semble indépendante de la dynamine mais dépendante du cholestérol (Mayor et al., 2014).

De façon étonnante, l'activation d'Arf6 ne semble pas nécessaire pour l'internalisation mais plutôt pour le recyclage des cargos et de ce fait, son inactivation est requise pour que les cargos puissent être dégradés (Naslavski et al., 2003).

Dans les cellules où la voie CG est fonctionnelle, Arf6 joue un rôle limité voire inexistant sur l'endocytose des cargos CG (Kumari et Mayor., 2008), même si l'inverse n'a pas encore été démontré. De ce fait, il n'est pas certain que la voie CG et celle médiée par Arf6 soit deux voies réellement distinctes. Il se pourrait que la voie Arf6 définisse plutôt un type spécialisé d'endosomes de recyclage plutôt qu'une voie d'endocytose à proprement parlé (Mayor et al., 2014).

1.4.3.5 La voie IL2R

La voie d'endocytose du récepteur de l'interleukine 2 (IL2R) fut la première voie d'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline à avoir été mise en évidence (Subtil et al, 1994; Sauvonnnet et al, 2005). En 2001, une étude en microscopie électronique a montré que l'IL2R est localisé au niveau d'invaginations de la membrane plasmique, dépourvues de manteau (Lamaze et al., 2001). Ces invaginations ont lieu au niveau de radeaux lipidiques expliquant que l'internalisation de l'IL2R est dépendante du cholestérol (Lamaze et al, 2001). L'homogénéité de la taille des vésicules contenant le récepteur (50 à 100 nm) ainsi que la concentration de l'IL2R dans des puits, sous-entend l'existence de protéines, qui permettent la formation de telles vésicules. La structure de la vésicule permettant l'internalisation du récepteur n'a cependant pas encore été mise en évidence.

L'IL2R est composé de trois chaînes, α , β et γ , mais seules les sous-unités IL2R β et γ permettent de délivrer une cascade de signalisation intracellulaire. En l'absence de ligand, l'IL2R β et γ peuvent être internalisées indépendamment l'une de l'autre (Hemar et al, 1994). La présence du ligand IL2 induit l'oligomérisation du récepteur permettant ainsi une internalisation plus rapide (Morelon et al, 1996). De plus le ligand permet l'activation des voies de signalisations JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), MAPK (Mitogen Activated protein Kinase) et PI3K; l'induction de ces cascades de signalisation conduisant à la progression du cycle cellulaire, à la survie cellulaire et à la prolifération (Gaffen, 2001).

Il a été montré que les 27 premiers acides aminés cytosoliques dans le cas d'IL2R β , et 3 régions de la partie cytosolique pour γ sont nécessaires à l'internalisation du récepteur (Morelon & Dautry-Varsat, 1998; Subtil et al, 1997).

La polymérisation de l'actine ainsi que les protéines RhoA (Ras homolog gene family, member A) et Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) semblent nécessaires à l'endocytose de l'IL2R (Sauvonnnet et al., 2005; Grassart et al, 2008; Lamaze et al, 2001). La PI3K a de plus été décrite comme un élément régulateur de l'endocytose de l'IL2R (Basquin

et al., 2013). En effet, cette kinase permet, grâce à son activité catalytique, le recrutement de Vav2, un facteur d'échange de guanine capable d'activer Rac1. D'autre part, la PI3K jouerait un rôle d'échafaudage en interagissant avec l'IL2R et Rac1 (Basquin et al., 2013). Rac1 active ensuite la kinases Pak1 (Serine/threonine-protein kinase PAK 1) qui en phosphorylant la cortactine conduit au recrutement de N-WASP (neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein) (Grassart et al, 2008; Grassart et al, 2010; Sauvonnnet et al, 2005). Cette cascade conduirait à la formation d'un complexe composé de la cortactine, N-WASP et Arp2/3 conduisant à la polymérisation de l'actine permettant l'entrée du récepteur (Figure 23).

Enfin, comme pour la CME, la dynamine est nécessaire pour l'étape de scission de la vésicule contenant l'IL2R. De plus, la dynamine contribuerait au recrutement de la cortactine au site d'endocytose ce qui facilite la fission de la vésicule (Sauvonnnet et al., 2005). D'autres récepteurs, tels que le transporteur de glucose 4 (GLUT4) (Antonescu et al, 2009), FcεR (Fattakhova et al, 2006) ou encore l'APP (Amyloid Precursor Protein) (Saavedra et al., 2007) utilisent la même voie d'endocytose que l'IL2R.

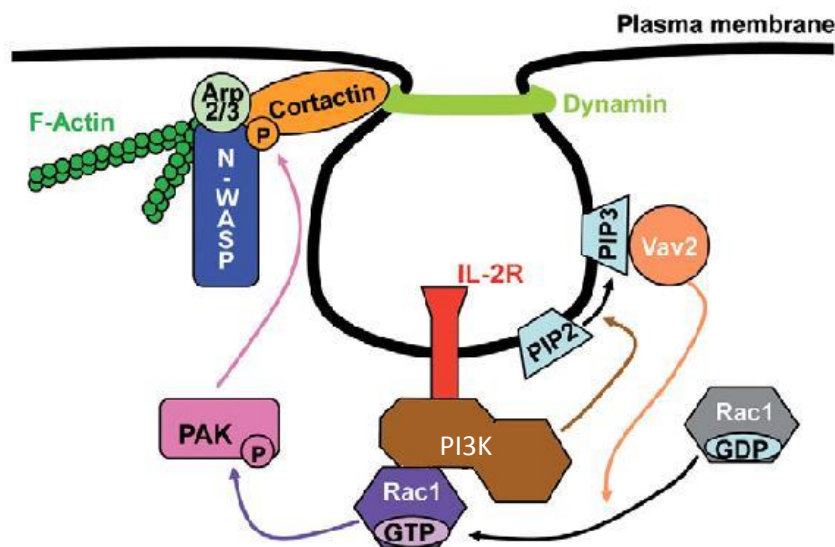


Figure 23 : Endocytose de l'IL2R et protéines impliquées dans cette voie d'internalisation

La PI3K interagit avec l'IL2R et permet, en synthétisant du PIP3, le recrutement de Vav2 qui va activer Rac1. Rac1 va pouvoir ainsi activer la kinase PAK1 qui va à son tour phosphoryler la cortactine et recruter les facteurs (N-WASP, Arp2/3) de polymérisation de l'actine, associés à la formation de la vésicule d'endocytose. La dynamine est impliquée dans la fission de la vésicule. Adapté de Basquin et al., 2013

1.4.3.6 La voie médiée par les endophilines (FEME : Fast Endophilin Mediated Endocytosis)

Initialement, les endophilines (protéines à domaine BAR), ont été associées à la CME. En effet, il a été montré que les endophilines A (1,2,3) permettent de recruter la dynamine et la synaptojanine, une protéine impliquée dans le démantèlement du manteau de clathrine, sur la vésicule en cours de formation (Ringstad et al., 1997). De plus, les endophilines ont été détectées au niveau des puits à clathrine en microscopie électronique et de fluorescence (Milosevic et al., 2011 ; Taylor et al., 2011) et des mutations des endophilines bloquent la formation par CME des vésicules aux neurotransmetteurs (Verstreken et al., 2002). Cependant, plusieurs évidences suggèrent aujourd'hui que le rôle des endophilines dans la CME est secondaire. En effet, seulement un quart des puits à clathrine sont positifs pour les endophilines (Perrera et al., 2006 ; Taylor et al., 2011) et la déplétion des 3 isoformes de l'endophiline A n'affecte pas l'internalisation de la transferrine (Meinecke et al., 2013). De plus, l'équipe de De Camilli a montré dans des neurones de souris ko pour les 3 isoformes d'endophilines, que ni la formation ni la fission des vésicules à clathrine n'est réellement affectée mais simplement, que le manteau de clathrine reste associé aux vésicules néoformées (Milosevic et al., 2011).

Récemment, une étude a montré que de nombreux cargos pouvaient être endocytés par une voie CIE dépendante des endophilines (Boucrot et al., 2014). Cette nouvelle CIE a été baptisée voie rapide médiée par les endophilines (FEME : Fast Endophilin Mediated Endocytosis) (Boucrot et al., 2014). En plus de l'IL2R (Interleukin 2 Receptor), de nombreux GPCR (récepteurs couplés aux protéines G), des récepteurs adrénergiques, des récepteurs dopaminergiques ainsi que de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase (dont l'EGFR à forte concentration) seraient internalisés par cette voie. De plus les toxines STxB et CTxB emprunteraient également cette voie d'endocytose (Renard et al., 2014). En revanche, les cargos de la CME tels que la transferrine, le récepteur au LDL ainsi que les récepteurs CD44 et CD47 (voie CG) ne semblent pas être internalisés par la voie FEME. Cette voie FEME, stimulée par la fixation de ligands sur leur récepteur et dépendante du cholestérol, permet une entrée rapide des cargos par des compartiments tubulo-vésiculaires ressemblant à ceux de la voie CG, mais bien distincts de ceux-ci.

En ce qui concerne le fonctionnement moléculaire, les endophilines seraient recrutées à la membrane plasmique (via leur domaine SH3 et indépendamment de leur domaine BAR) par la lamellipodine, une protéine qui peut lier le PIP2. Les auteurs ont remarqué que les endophilines colocalisent au bord de la cellule avec ses principaux interacteurs (Dynamine, synaptojanine, lamellipodine) et la F-actine, mais pas avec les marqueurs classiques des autres CIE comme la caveoline 1, la flotilline 1 ou GRAF1. Il a été proposé que les endophilines contrôlent cette voie avec ses partenaires CIN85 (Cbl INteracting protein 85 kDa) et Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma) puisque leur déplétion affecte le recrutement des endophilines à la membrane plasmique (EPA : Endophilins Positive Assemblies). De plus, la formation de ces compartiments est stimulée par des facteurs de croissance et semble dépendante de Rac1, de la PI3K, de PAK1 et de RhoA (Boucrot et al., 2014).

Les travaux de Renard et al, ont quant à eux impliqués *in vitro* (GUV) l'endophiline A2 dans la fission des tubules formés par la STxB. En effet, l'endophiline A2 recouvrirait ces tubules, ce qui aurait pour effet d'entraîner la fission en augmentant la tension membranaire entre la partie libre du tubule et celle recouverte par l'endophiline A2. Cette fonction de fission semble dépendante, en plus du domaine BAR, de la présence d'hélices amphipathiques puisque l'utilisation de l'endophiline A2 déletée de cette hélice, n'induit pas la scission du tube. Ces résultats ont été confirmés *in cellulo* car les auteurs ont montré que lorsque les cellules sont dépletées en endophiline A2, les invaginations de la membrane plasmique contenant STxB sont beaucoup plus longues que dans les cellules contrôles. De plus, ces invaginations formées par STxB sont encore plus longues si la polymérisation de l'actine est inhibée et que la dynamine est dépletée. Ces résultats suggèrent donc que ces trois facteurs opèrent en parallèle pour induire la scission du tube (Renard et al., 2014).

Pour résumer, le domaine SH3 des endophilines contribuerait à leur recrutement à la membrane plasmique, leur domaine BAR induirait la courbure de la membrane et l'insertion de multiples hélices amphipathiques contribuerait avec la dynamine et l'actine à la scission du compartiment en formation. Ces trois caractéristiques des endophilines font qu'elles tiennent une importance centrale dans le fonctionnement de cette voie (Figure 24).

Cette voie FEME pourrait expliquer les observations faites sur l'importance de l'endophiline A1 dans la CIE rapide à la synapse (Llobet et al., 2011). La découverte de cette nouvelle voie, pourrait permettre de regrouper plusieurs CIE et de ce fait, simplifier un peu la classification des voies d'endocytose.

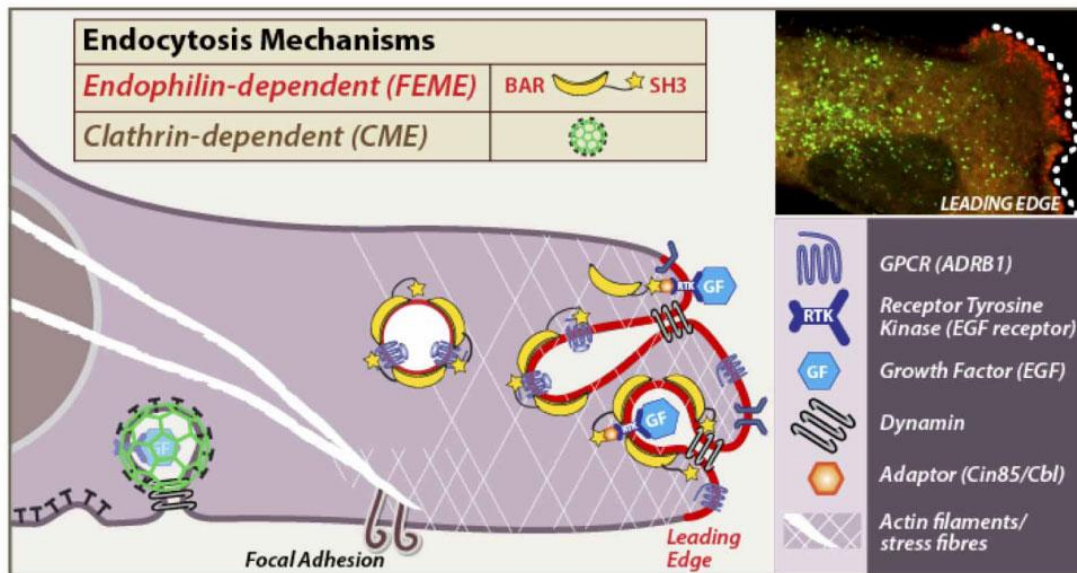


Figure 24 : Schéma représentatif de la voie FEME

La CIE dépendante des endophilines permet notamment l'entrée de récepteurs à activité tyrosine kinase (comme l'EGFR) et de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Les endophilines tiennent une importance centrale dans le fonctionnement de cette voie puisqu'elles induisent la courbure de la membrane plasmique mais aussi la fission de la vésicule en parallèle de la dynamine et de l'actine. Les partenaires des endophilines, CIN85, Cbl sont également impliqués dans cette voie. Adapté de Boucrot et al., 2014.

1.4.3.7 L'endocytose de l'EGFR

Le récepteur à l'EGF (EGFR : Epidermal Grow Factor Receptor) est un récepteur à activité tyrosine kinase, impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire (King & Sartorelli, 1986). En réponse à la liaison de son ligand, l'EGF, le récepteur se dimérise, induisant son autophosphorylation et l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et Erk1/2 (Extracellular signal-regulated kinases), impliquées dans la différenciation, la survie et la prolifération des cellules (Avraham & Yarden, 2011; Koyasu, 2003).

L'internalisation de l'EGFR illustre bien la complexité de l'endocytose des récepteurs et de leurs ligands. En effet, selon la concentration d'EGF, l'EGFR peut être internalisé soit par

CME, soit par CIE. En absence de son ligand, l'EGFR est endocyté constitutivement par CME (Wiley et al, 1991). L'ajout d'EGF, à une concentration physiologique ($< 1 - 2$ ng/mL) augmente la vitesse d'internalisation par la CME (Damke et al, 1994; Huang et al, 2004; Wiley et al, 1991). En présence de plus fortes concentrations d'EGF (5 - 1000 ng/mL), le récepteur est internalisé, en plus de la CME, par une ou plusieurs CIE (Jiang et al, 2003; Sigismund et al, 2005; Wiley, 1988) (Figure 29).

Initialement, le mécanisme moléculaire de l'endocytose de l'EGFR a été décrit dans le contexte de la CME. Il a ainsi été montré que pour être endocyté, l'EGFR activé recrute les ubiquitines ligases de la famille Cbl, dont c-Cbl (de Melker et al, 2001; Thien et al, 2001). La protéine c-Cbl serait recrutée par Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) qui interagit directement avec les tyrosines phosphorylées 1068 et 1086 de l'EGFR (Jiang et al, 2003). Cbl se lie aux résidus tyrosines phosphorylées et est en retour phosphorylée par le récepteur (Thien and Langdon, 2001). Cette phosphorylation permet le recrutement de CIN85 qui est constitutivement associé aux endophilines et le complexe CIN85/EGFR/endophilines ainsi formé entraîne l'endocytose du récepteur stimulé. Il est important de noter que les auteurs de ces travaux pensaient décrire le mécanisme d'entrée du récepteur par la CME. Sachant que ces résultats ont été obtenus lors de l'utilisation d'une forte concentration d'EGF, concentration que l'on sait aujourd'hui associée à une internalisation par CME et CIE de l'EGFR, le rôle précis de Cbl, de CIN85 et des endophilines dans la voie CME de l'EGFR reste à définir.

En ce qui concerne l'endocytose de l'EGFR par CIE, plusieurs voies ont été proposées. Dans les cellules HeLa, l'EGFR pourrait être internalisé par des ruffles circulaires sur la face dorsale de la cellule, de façon dépendante de la dynamine (CDR : Circular Dorsal Ruffle) (Orth et al, 2006).

L'EGFR a également été décrit comme étant internalisé par la voie des cavéoles (Sigismund et al, 2005), cependant ces résultats sont sujets à controverse (Kazazic et al, 2006).

Enfin, très récemment, la CIE dépendante des endophilines a été impliquée dans l'endocytose de l'EGFR à forte concentration (>5 ng/ml) puisque l'ajout d'EGF induit la formation des compartiments EPA (voir FEME). Cette voie d'endocytose du récepteur semble de plus dépendante de Cbl et de CIN85 (qui peuvent toutes deux s'associer à la fois à l'EGFR et aux endophilines) puisque la déplétion de l'une ou l'autre de ces deux protéines inhibe la formation des EPA induits par l'EGF (Boucrot et al., 2014).

Le rôle de l'actine et de sa machinerie dans la CIE de l'EGFR est peu connu, bien que N-WASP semble être impliquée (Benesch et al., 2005) et que les protéines RhoA et la cortactin

(Timpson et al., 2005) régulent négativement l'endocytose de l'EGFR. Dans le cadre de la voie FEME, des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine (Latrunculine A) ou de facteurs impliqués dans sa régulation (Arp 2/3, rac1, RhoA) diminuent la formation des EPA induits par l'EGF.

Initialement, l'entrée de l'EGFR en présence de forte concentration d'EGF a été décrite comme indépendante de la dynamine dans les cellules HeLa (Jiang et al, 2003). Cependant, d'autres études ont impliqué la dynamine dans la CIE de l'EGFR (Orth et al, 2006, Boucrot et al., 2014).

L'adressage de l'EGFR vers la CME ou la/les CIE dépendrait de l'état de phosphorylation du récepteur. En effet il a été proposé que l'augmentation de la phosphorylation du récepteur et donc de son état d'ubiquitination, est responsable de l'internalisation de l'EGFR par la CIE (Sigismund et al., 2013) (Figure 25). De plus, en fonction des besoins de la cellule, l'endocytose de l'EGFR par CME ou CIE serait important pour réguler son expression. En effet, lorsque l'EGFR entre par la CME, il est majoritairement recyclé à la surface cellulaire, alors que l'internalisation de l'EGFR par CIE est préférentiellement associé à la dégradation du récepteur (Sigismund et al, 2008; Sigismund et al, 2005).

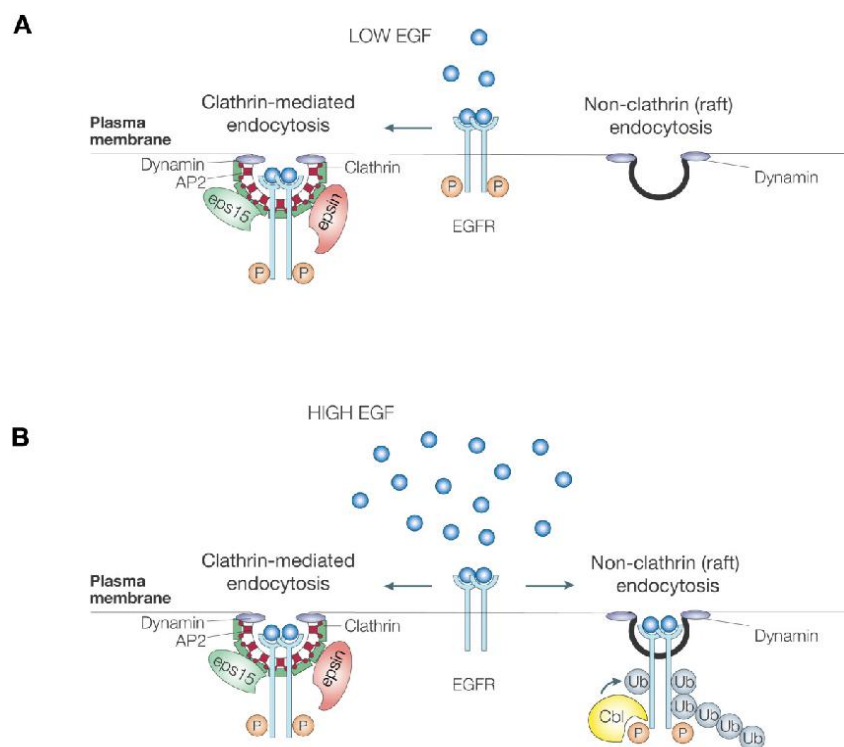


Figure 25 : La voie d'endocytose empruntée par l'EGFR dépend de la concentration d'EGF

A) A faible concentration d'EGF (< 2ng/ml), l'EGFR est internalisé par la CME

B) A forte concentration d'EGF, l'EGFR est internalisé à la fois par la CME et par la CIE. L'augmentation de l'ubiquitination du récepteur le dirige vers la CIE. Dans les deux cas, la dynamine semble impliquée dans la fission de la vésicule. L'implication d'autres acteurs moléculaires spécifiquement dans la CME ou dans la CIE de l'EGFR est encore floue à l'heure actuelle. Adapté de Woelk et al., 2007

1.4.4 Les voies d'endocytose à grande échelle

Toutes les voies d'endocytose précédemment décrites sont caractérisées par la formation de vésicules ou tubules de diamètre inférieur à 200 nm. Cependant, la cellule peut aussi internaliser du matériel de manière moins spécifique, dans des structures plus grandes, qui peuvent faire plusieurs micron de diamètre. La macropinocytose et la phagocytose sont les deux représentants de ce type d'endocytose.

1.4.4.1 Macropinocytose et Circular Dorsal Ruffle (CDR)

Ce type d'endocytose repose sur la génération de protrusions (ruffles) membranaires qui vont se refermer en fusionnant et permettre ainsi l'internalisation d'un grand volume de matériel, dans des vésicules de tailles supérieures à 200 nm (Kerr & Teasdale, 2009; Lim & Gleeson, 2011; Swanson, 2008), appelées macropinosomes (Figure 26). Ce phénomène nécessite un important réarrangement de la membrane plasmique et l'actine y joue de ce fait, un rôle très important. Bien que la macropinocytose soit un processus connu depuis de nombreuses années (Warren Lewis, 1931), les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce type d'endocytose restent flous. Cependant, il a pu être montré que les protéines qui régulent la macropinocytose sont en grande partie des facteurs impliqués dans la régulation de la polymérisation de l'actine branchée via l'activation des protéines WASP et WAVE (Innocenti et al, 2005). Ainsi on retrouve parmi ces régulateurs, les Rho GTPase Cdc42 et Rac1 (Garrett et al, 2000), ou encore la PI3K de classe I (Araki et al, 1996). De plus, la kinase Pak1 (p21 protein activated kinase 1) est nécessaire et suffisante pour induire la formation de macropinosomes (Dharmawardhane et al., 2000) notamment via son activation par Rac1.

Dés 1979, il a été montré que des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que l'EGFR ou le PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) pouvaient activer la polymérisation de l'actine à la membrane plasmique (Haigler et al., 1979), ce qui induit la formation de ruffles et augmente donc la probabilité de formation de macropinosomes.

Des études plus récentes ont mis à jour une variante de la macropinocytose ; des ruffles circulaires qui se forment sur la face dorsale des cellules (Circular Dorsal Ruffle : CDR) (Figure 30) en réponse à l'EGF (Orth et al, 2006). Ce type d'endocytose serait à l'origine de la désensibilisation à l'EGF lors de fortes concentrations de ce ligand, via un retrait rapide d'un grand nombre de récepteurs de la membrane plasmique. Bien que beaucoup soit communs (Figure 30), les acteurs moléculaires impliqués dans les CDR ne sont pas tous

identiques à ceux impliqués dans la macropinocytose. Ainsi, Arf 1 et 2 et WAVE 1 (Suetsugu et al, 2003 ; Hasegawa et al, 2012) sont impliquées dans la voie CDR alors qu'Arf6 et WAVE 2 (Heckel et al, 2009; Suetsugu et al, 2003) sont impliqués dans la macropinocytose.

La SNX9 (Sorting Nexin 9), a été proposé comme élément de régulation de la formation des CDR, en permettant le lien entre la machinerie de polymérisation de l'actine (N-WASP) et les phosphoinositides de la membrane plasmique via son domaine PX et son domaine BAR (Yarar et al., 2007).

La dynamine qui, en recrutant la cortactine et ainsi favorise la polymérisation de l'actine, semble quand à elle impliquée dans la formation des CDR mais pas dans la macropinocytose classique (Cao et al, 2007).

Après son internalisation, le macropinosome est capable de fusionner avec les compartiments « classiques » de la voie endocyttaire ou être recyclé, selon le type cellulaire et les facteurs de croissance impliqués (Kerr & Teasdale, 2009; Lim & Gleeson, 2011).

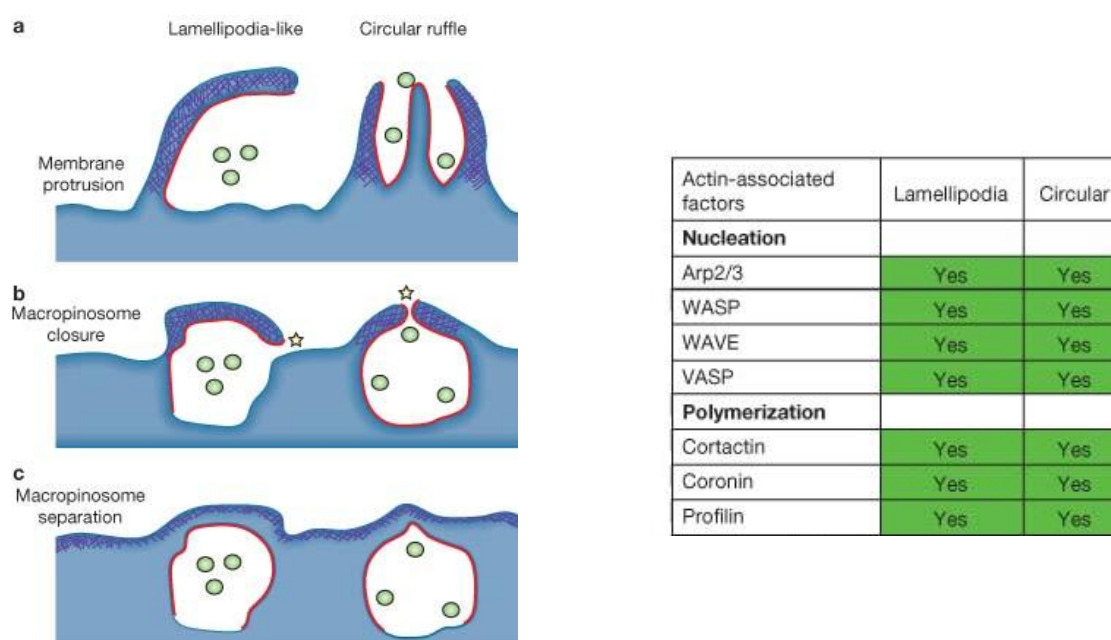


Figure 26 : Représentation des 2 modèles de macropinocytose et les protéines associées à l'actine impliquées dans ces modèles.

A) Une protrusion de la membrane plasmique, de type lamellipode ou CDR, va se former.

B) En se refermant, la protrusion va englober un grand volume de milieu extra cellulaire.

C) La membrane en fusionnant forme le macropinosome.

Comme le montre le tableau, dans les deux modèles, plusieurs facteurs d'initiation et d'activation de la polymérisation de l'actine sont impliqués. Adapté de Mercer and Helenius, 2009

1.4.4.2 La phagocytose

La phagocytose est une voie d'endocytose qui permet l'ingestion, par la cellule, de particules de grandes tailles (bactéries, débris cellulaire ou cellules) à l'intérieur de vésicules appelées phagosomes, dont la taille peut varier de quelques centaines de nanomètres à plusieurs micromètres (Flannagan et al, 2012). Cette voie d'endocytose est la première voie à avoir été décrite et est principalement observée dans des cellules spécialisées (macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles).

La formation du phagosome, peut s'effectuer de différentes manières (Figure 27). Le modèle dit à fermeture éclair (« zipper model ») est médié par certains récepteurs tel que le récepteur Fc (FcR : Fragment crystallisable Receptor) (Flannagan et al, 2012). Dans ce cas, le corps étranger, opsonisé d'immunoglobulines de type G (IgG) est reconnu à la surface de la cellule par les FcR. Cette reconnaissance entraîne la formation de pseudopodes qui vont s'étendre autour du corps étranger et l'englober en formant ainsi le phagosome. Ce mécanisme de phagocytose requiert la PI3K, Cdc42, Rac1, N-WASP, WAVE et le complexe Arp2/3 (actin related protein), des facteurs associés à la polymérisation de l'actine (Beemiller et al, 2010; Higgs & Pollard, 2000; Matsui et al, 2002; May et al, 2000). L'autre modèle de phagocytose massivement étudié est celui impliquant le récepteur (CR3) au composant du complément C3bi. Il existe deux modèles du mécanisme de formation du phagosome induit par CR3. Le premier stipule que la particule reconnue pourrait s'enfoncer dans la membrane, sans nécessiter de protrusions membranaires, mais ce modèle historique est sujet à controverse et ne pourrait être qu'un biais d'observation (Flannagan et al, 2012). L'autre modèle présente des similarités avec la macropinocytose puisque la particule opsonisée par C3bi serait recrutée par CR3 au niveau de « ruffles » préexistants. L'interaction ligand-récepteur, conduirait ensuite le « ruffle » à se refermer sur la particule à internaliser, englobant en même temps un volume important de milieu extracellulaire (Patel & Harrison, 2008). Durant ce processus, Arp2/3 (May et al, 2000), RhoA (Caron & Hall, 1998) ainsi que les formines (Colucci-Guyon et al, 2005) participent à la polymérisation de l'actine qui est associée à la déformation membranaire.

Quel que soit le modèle de formation, après son détachement de la membrane plasmique, le phagosome acquiert des marqueurs d'endosomes précoces, puis d'endosomes tardifs et enfin de lysosomes afin de former un phagolysosome dans lequel les particules internalisées seront dégradées (Flannagan et al, 2012).

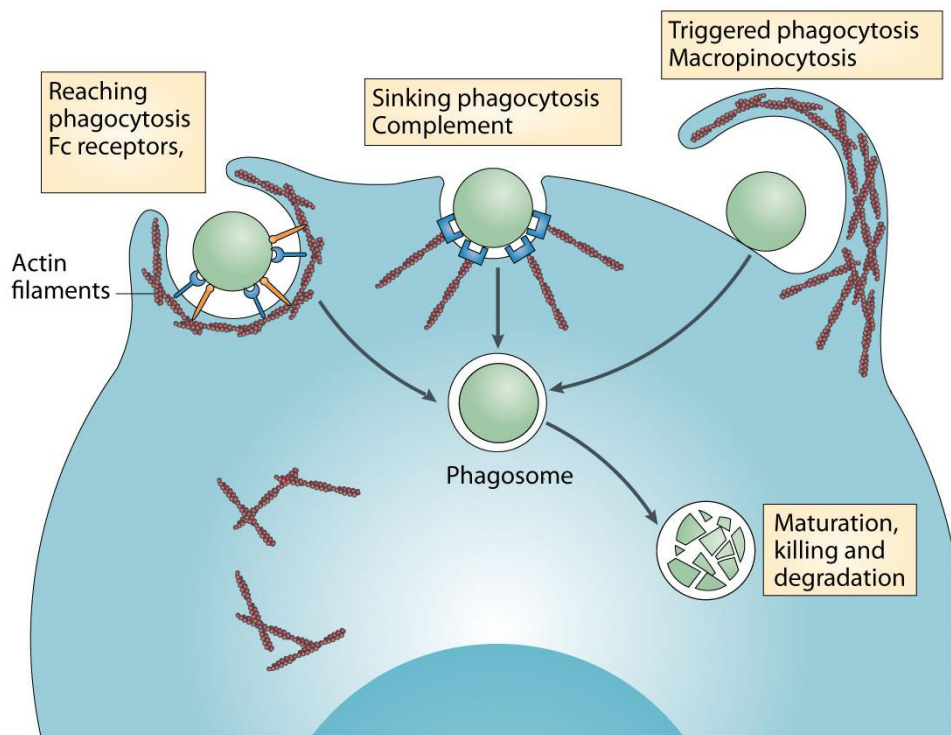


Figure 27 : Les différents modèles de phagocytose

Le modèle dit de « fermeture éclair » médié par FcR implique la formation de pseudopodes qui englobe le corps étranger. Le deuxième modèle propose que CR3 s'enfonce dans la cellule sans nécessiter de protrusions. Le dernier modèle propose quand à lui que CR3 induit à la formation d'une protrusion qui englobe le récepteur et un grand volume de milieu extracellulaire. Ce phénomène est comparable à la macropinocytose. Dans tout les cas, le matériel phagocyté est piégé dans le phagosomes et dégradé après maturation de ce dernier.

Adapté de Underhill and Goodridge, 2012

1.3.Le trafic endolysosomal

Une fois formée, que ce soit par CME ou par CIE, la vésicule d'endocytose, contenant le matériel internalisé, va rejoindre un système endomembranaire très dynamique. Les endosomes, qui sont les compartiments de ce système, vont faire office de plateforme pour le tri du matériel internalisé. Ce matériel pourra alors, soit être recyclé à la membrane plasmique, soit être dégradé au niveau du lysosome, un compartiment spécialisé de la voie endolysosomale (Figure 28).

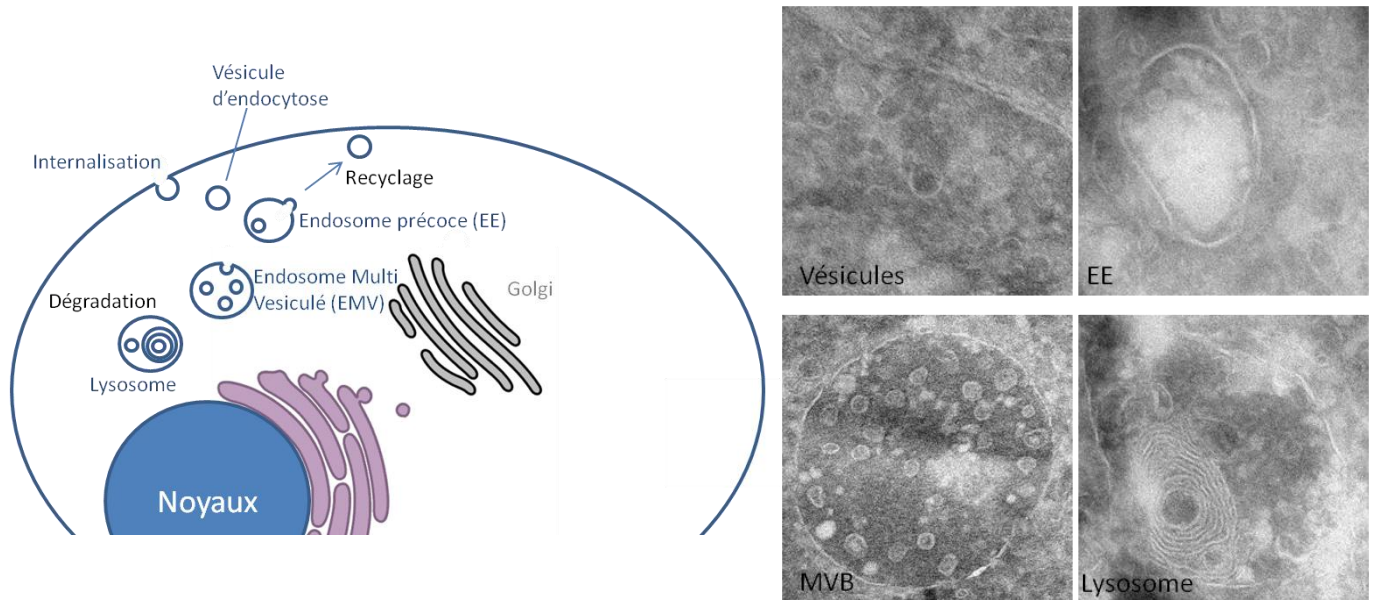


Figure 28 : Les compartiments de la voies endolysosomale

Représentation schématique des différents compartiments de la voie endolysosomale (à gauche) et images de microscopie électronique de ces compartiments dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (à droite)

1.3.1 L'endosome précoce (EE)

L'endosome précoce (EE : Early Endosome) a été défini comme le compartiment endocytaire recevant le matériel endocyté (Helenius et al., 1983). En effet, la vésicule d'endocytose néoformée dépourvue de manteau de clathrine va, en quelques minutes, fusionner avec l'EE, qui joue le rôle de première station de tri des molécules internalisées. C'est en effet au niveau de l'EE que les récepteurs internalisés vont être sélectivement triés vers la voie de dégradation, de recyclage ou envoyés à l'appareil de Golgi. Ce compartiment, proche de la membrane plasmique est caractérisé par un pH légèrement acide (6,5), la présence de tubules qui bourgeonnent vers le cytoplasme et de quelques vésicules intraluminales (ILV). La balance entre, les vésicules en provenance du TGN que l'EE reçoit et les vésicules de recyclage qui bourgeonnent permet de réguler finement la taille de ce compartiment.

L'EE se caractérise par la présence au niveau de sa membrane, du PI3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphate) (Gillooly et al., 2000). Ce lipide régule la plupart des fonctions retrouvées au niveau de l'EE, principalement en recrutant des facteurs protéiques qui portent des domaines d'interaction avec les lipides comme les domaines FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1) ou PX (PhoX) (Lemmon et al., 2008). Le PI3P est important pour la fusion des vésicules d'endocytose avec l'endosome, pour la mobilité de l'endosome ou encore pour le tri de récepteurs ubiquitylés dans les vésicules intraluminales (ILV: Intra Luminal Vesicles) des endosomes (Petiot et al., 2003 ; Bissig and Gruenberg, 2013). Les protéines de la famille des PI3K (phosphatidylinositol-3-kinases) permettent la synthèse des phosphoinositides et notamment celle du PI3P en phosphorylant le groupement inositol du PI (Phosphatidylinositol) (Backer, 2008). D'un autre côté, des phosphatases vont déphosphoryler les phosphoinositides. Ces kinases et phosphatases vont donc réguler la production des phosphoinositides, notamment celle du PI3P, au niveau des compartiments endocytaires. De ce fait, ces 2 familles d'enzymes jouent un rôle très important dans la régulation de la voie endolysosomale (Bissig and Gruenberg, 2013).

L'EE est également caractérisé par la présence de plusieurs protéines de la famille Rab (Ras related protein). Les protéines Rab sont des petites GTP-ase monomériques présentes tout au long de la voie endocytaire (Figure 29). Ces protéines régulent la plupart des fonctions endosomales (Wandinger-Ness and Zerial, 2014). Au niveau de l'EE la protéine Rab5, joue un rôle clé puisqu'elle est impliquée dans les mécanismes de fusion des vésicules d'endocytose avec l'EE, la formation des vésicules et le déplacement de l'endosome précoce le long des éléments du cytosquelette (Wandinger-Ness and Zerial, 2014). La protéine Rab5 est capable de recruter différents composants de la machinerie de fusion telles que les protéines SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) et interagit également avec les PI3K (notamment celles de classe III) ce qui permet de moduler localement la composition en PI. Enfin, Rab 5 interagit directement avec EEA1 (Early Endocytic Antigen 1), un autre marqueur de l'EE, qui est impliqué dans la fusion des vésicules d'endocytose avec l'EE (Wandinger-Ness et Zerial 2014).

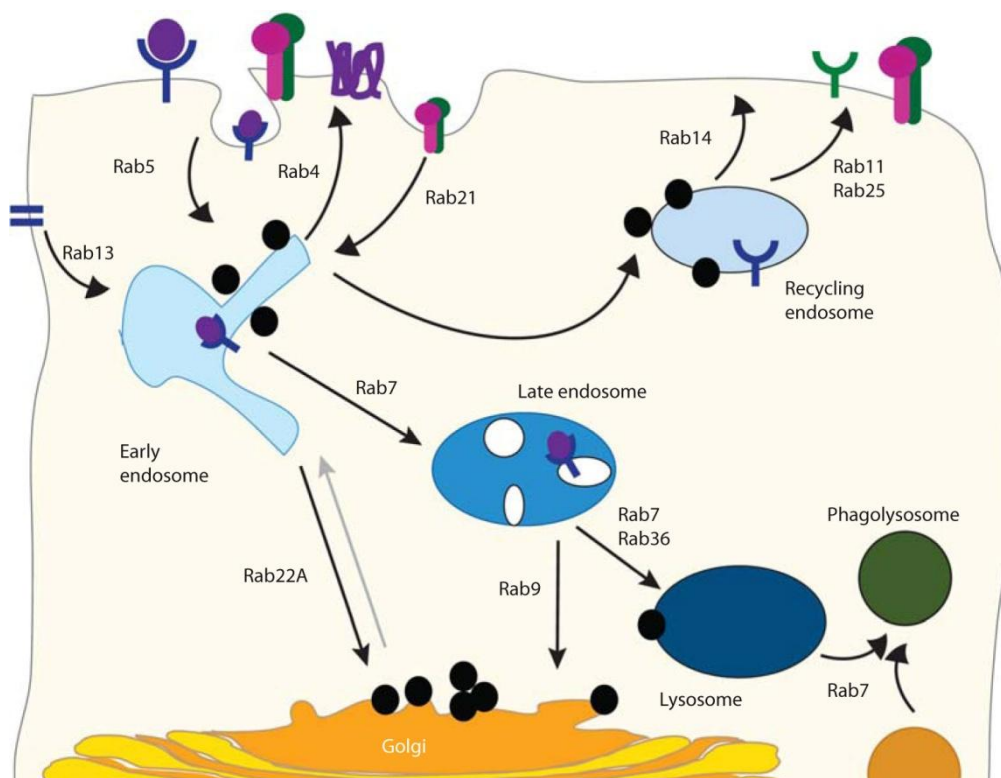


Figure 29 : Les protéines de la famille Rab sont présentes tout au long de la voie endolysosomale et régulent la plupart des fonctions des endosomes

Les différentes protéines Rab interviennent dans la plupart des compartiments intracellulaires. Au sein de la voie endolysosomale, les protéines Rab régulent la plupart des fonctions des endosomes, comme le recyclage ou la maturation des compartiments. Adapté de Wandinger-Ness and Zerial, 2014

Une partie de l'EE est capable de bourgeonner et de former des vésicules de recyclage (via l'implication de Rab4) alors que d'autres parties vont pouvoir se différencier en compartiment de recyclage (via l'implication de Rab11a). Un des modèles expliquant cette spécialisation progressive de l'EE est « l'organisation des GTPases en microdomaines, qui diffusent latéralement à la surface de l'endosome et coordonnent le trafic intracellulaire dans l'espace et le temps » (Harald Stenmark, 2009).

Une fois dans la membrane de l'EE, les protéines transmembranaires vont pouvoir, à partir des tubules, être recyclées en bourgeonnant dans des vésicules qui vont aller fusionner avec la membrane plasmique. Ce mécanisme est sous la dépendance de la petite GTPase Rab4 (Sonnichsen et al., 2000).

Les récepteurs ubiquitinés, portant un signal positif de dégradation, vont quant à eux pouvoir être internalisés au sein de l'EE dans les ILV afin de rejoindre des endosomes tardifs puis le lysosome, ou ils seront dégradés (Figure 30). Dans la plupart des cas, cette incorporation dans

les ILV va séparer le récepteur de ses effecteurs cytosolique et va donc contribuer de façon significative à l'arrêt de la signalisation.

L'ubiquitination est une modification post traductionnelle qui consiste à lier de façon covalente une ou plusieurs protéines ubiquitine (8kDa) sur une ou plusieurs lysines de la protéine cible. Cette ubiquitination est réalisée par des enzymes spécifiques, les ubiquitines ligases. L'ubiquitination peut être utilisée pour adresser, une protéine cytosolique cible au protéasome ou une protéine membranaire vers la voie de dégradation endolysosomale. Dans le cas des protéines membranaires, l'ubiquitination sert parfois de signal d'internalisation, mais est avant tout un signal de prise en charge de la protéine par les complexes ESCRT, afin qu'elle soit internalisée dans les ILV et dégradée au niveau du lysosome (Urbé, 2005 ; Haglund and Dikic., 2012).

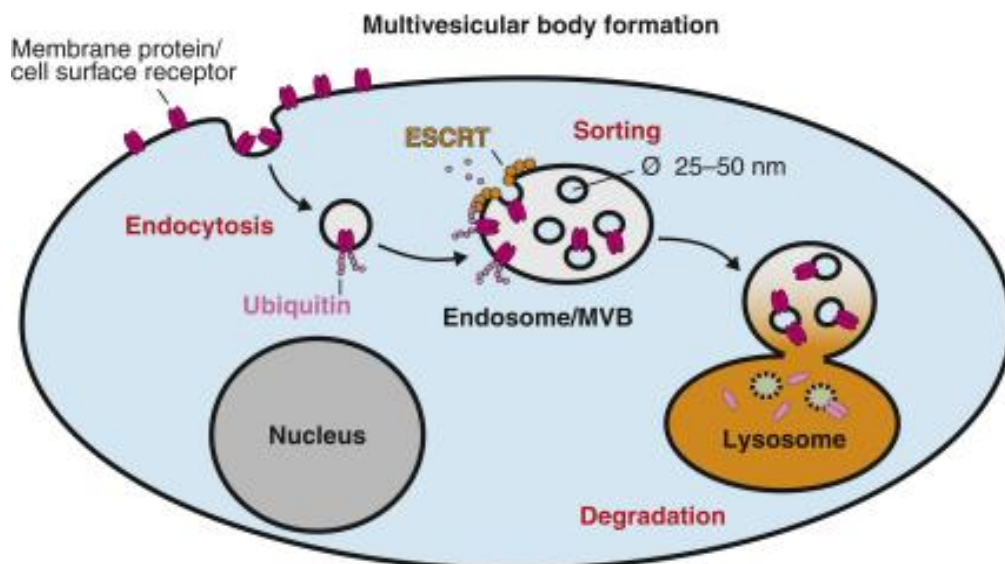


Figure 30 : L'ubiquitination adresse les protéines membranaires vers la voie de dégradation

Les récepteurs membranaires endocytés vont être ubiquitinés sur leur partie cytoplasmique, ils seront alors pris en charge par les complexes ESCRT, incorporés au sein des ILV et dégradés au niveau du lysosome. Adapté de Schmidt and Teis, 2012

1.3.2 Formation des vésicules intra-luminales (ILV) des endosomes

La formation des ILV qui est une caractéristique des endosomes (endosome multivésiculé) est sous la dépendance d'une machinerie moléculaire spécialisée et très conservée à travers les espèces, les complexes ESCRT.

1.3.2.1 Découverte des ESCRT

Des études menées chez *saccharomyces cerevisiae* ont conduit à l'identification de gènes impliqués dans l'adressage des protéines à la vacuole (équivalent du lysosome chez les mammifères) (Rothman and Stevens, 1986). Une cinquantaine de mutants impliqués dans le trafic endocytaire, appelés Vps (Vacuolar protein sorting) ont pu être classés en sous famille (Bryant and Stevens, 1998). En 1992, l'équipe de Raymond remarqua qu'une partie de ces mutants induisaient l'accumulation d'endosomes tardifs aberrants. Ce phénomène était dû à un défaut de formation des endosomes multivésiculés (EMV), qui furent appelés compartiments de classe E. L'absence de vésicules dans les endosomes de classe E a permis d'établir le lien entre la formation des ILV et la dégradation des cargos. Les protéines associées ont été appelées Vps de classe E et sont au nombre de 17. Ces Vps de classe E sont impliquées dans le transport des protéines destinées à la vacuole et plus particulièrement dans leur adressage dans les ILV ainsi que dans la formation des ILV. Les Vps de classe E sont conservées depuis la levure jusqu'aux mammifères et la plupart font partie de la machinerie de transport endosomal ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) (Table 2).

Complexe	Levure	Synonymes	Humain	Synonymes Humain
ESCRT-0	Vps27		HRS	HGS
	Hse1		STAM1	
			STAM2	
ESCRT-I	Vps23	Stp22	TSG101	VPS23
	Vps37	Srn2	VPS37A	HCRP1, PQBP2
			VPS37B	
			VPS37C	PML39
			VPS37D	WBSCR24
	Vps28		VPS28	
	Mvb12		MVB12A	FAM125A, CFBP
			MVB12B	FAM125B, C9orf28
			UBAP1	
ESCRT-II	Vps36		VPS36	EAP45
	Snf8	Vps22	VPS22	EAP30, SNF8, DOT3
	Vps25		VPS25	EAP20, DERP9, FAP20
ESCRT-III	Vps20	Chm6	CHMP6	VPS20
	Snf7	Vps32, Did1	CHMP4A	VPS32A, SNF7-1, HSPC134, SHAX2
			CHMP4B	VPS32B, SNF7-2, CTPP3, SHAX1
			CHMP4C	VPS32C, SNF7-3, SHAX3
	Vps24	Did3	CHMP3	VPS24, NEDF
	Vps2	Did4, Chm2	CHMP2A	VPS2A, BC-2
			CHMP2B	VPS2B, DMT1
	Did2	Vps46, Chm1	CHMP1A	VPS46A, PCOLN3, PRSM1
			CHMP1B	VPS46B
	Vps60	Chm5	CHMP5	VPS60, PNAS2, HSPC177
	Ist1		IST1	KIAA0174, PM28
	Yjl049w		CHMP7	
Vps4 complex	Vps4	End13	VPS4A	
			VPS4B	SKD1
	Vta1		LIP5	VTA1, SBP1, DRG1, HSPC228
Bro1 proteins	Bro1	Vps31	ALIX	AIP1, PDCD6IP, DRIP4, HP95
			HDPTP	PTP-TD14
			BROX	BROFTI
	Rim20			

Table 2: Nomenclature des protéines ESCRT chez la levure et les mammifères. Adapté de Hanson et Cashikar 2012

1.3.2.2 Mécanisme de formation des ILV par les ESCRT

Comme je l'ai précédemment mentionné, les récepteurs endocytés ubiquitinés sont incorporés dans les ILV. Ce mécanisme particulier de bourgeonnement s'opère depuis le cytosol vers la lumière de l'endosome et est sous la dépendance de la machinerie moléculaire ESCRT.

Cette famille de protéines est composée de quatre complexes protéiques, nommés en fonction de leur ordre de recrutement : ESCRT-0 (Katzmann et al., 2003), ESCRT-I (Katzmann et al., 2001), ESCRT-II (Babst et al., 2002) et ESCRT-III (Babst et al., 2002) (Figure 31). Les autres Vps de classe E sont des protéines accessoires des complexes ESCRT qui permettent leur

recrutement comme Bro1 (Alix chez les mammifères), ou leur désassemblage comme la protéine chaperonne AAA ATPase Vps4 (Babst et al., 1997).

La formation des ILV a lieu dès l'endosome précoce et est initiée par le complexe ESCRT-0, composé des protéines STAM (Signal Transducing Adaptor Molecule)/Hse1 et Hrs (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrat)/Vps27. La protéine Hrs est recrutée sur la partie cytoplasmique ubiquitinée du récepteur transmembranaire via un domaine d'interaction à l'ubiquitine. Hrs reconnaît également le PI3P à la membrane de l'endosome via un domaine FYVE. Enfin, la queue C-terminale d'Hrs contient un domaine de liaison avec Tsg101 (Tumor susceptibility gene 101)(Bache et al., 2003) et transfère ainsi la partie ubiquitinée de la protéine à dégrader sur le complexe ESCRT-I composé des protéines TSG101, Vps 28, Vps 37 et MVB 12 (Katzmann et al., 2001 ; Chu et al., 2006; Morita et al., 2007). Les protéines cargo ubiquitinées passent ensuite d'ESCRT-I à ESCRT-II, qui est formé des protéines Vps36, Vps22 et Vps25, nous avons à ce stade un bourgeon vésiculaire. Ce complexe ESCRT-II permet de faire le lien (via Vps 25) entre ESCRT-I et ESCRT-III. Le complexe ESCRT-III est quant à lui constitué des protéines Vps20, Vps24, Vps2 (CHMP2 A/B chez les mammifères), et Vps32/SNF7 (Sucrose Non Fermenting) (CHMP4 A/B/C chez le mammifères). Ce complexe possède la capacité de fission de l' ILV en cours de formation. En effet, lorsque le complexe ESCRT-III est associé à la membrane endosomale, il permet, en polymérisant, le rapprochement des feuilletts de la bicouche lipidique et donc la fission et l'individualisation de la vésicule. La dissociation du complexe ESCRT-III est nécessaire pour que la fission de la vésicule puisse avoir lieu (et soit libérée dans la lumière de l'endosome), cette fonction est assurée par l' ATP-ase Vps4.

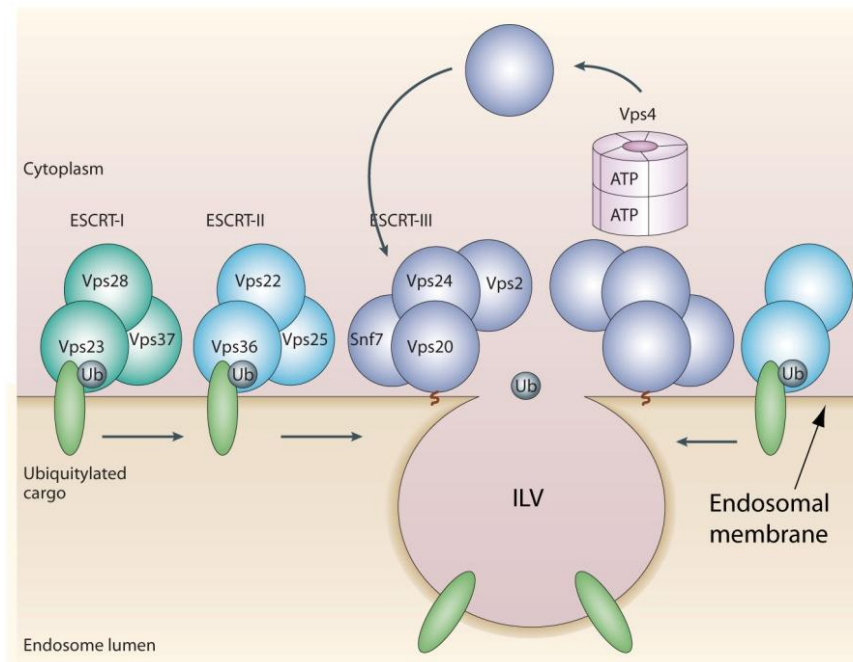


Figure 31 : Formation des endosomes multivésiculés par la machinerie ESCRT

Représentation schématique de l'assemblage séquentiel des complexes ESCRT sur la face cytosolique de la membrane endosomale. Les complexes ESCRT sont recrutés par un signal ubiquitine sur les cargos à dégrader. Ces complexes permettent à la fois la prise en charge des cargos à dégrader et leur internalisation dans des ILV. Le complexe ESCRT-0 qui reconnaît le récepteur ubiquitiné n'est pas représenté sur ce schéma. Adapté de Gruenberg and Stenmark, 2004.

1.3.2.3 Formation des ILV par le LBPA

Le LBPA (Lyso Biphosphatidic Acid) est un phospholipide non conventionnel enrichie dans les endosomes multivésiculés (EMV) (Kobayashi et al., 1998). Le LBPA a été impliqué dans la formation des ILV puisque l'utilisation d'anticorps dirigés contre ce lipide, bloque la formation des ILV et désorganise la morphologie des EMV (Kobayashi et al., 1998). De plus, *in vitro*, des liposomes acides préparés à partir de LBPA forment spontanément des ILV analogues aux vésicules observées dans les EMV (Matsuo et al., 2004). La protéine accessoire des complexes ESCRT, Alix, est impliquée dans la formation des ILV dépendante du LBPA (Matsuo et al., 2004). Ces travaux suggèrent que l'enrichissement en LBPA au niveau des endosomes permet un processus de vésiculation à l'origine de la formation d'une population d'EMV.

Plus récemment, le LBPA a été impliqué dans le processus de back-fusion permettant aux ILV, de fusionner avec la membrane de l'EMV et de libérer le contenu dans le cytosol. Ce mécanisme permet ainsi au contenu de l'ILV d'échapper à la dégradation dans le lysosome. Ce processus de back-fusion, utilisé par certains virus pour infecter la cellule hôte, serait étroitement contrôlé par le LBPA et la protéine Alix (Alg-2 Interacting protein X) de façon calcium dépendante (Bissig et al., 2013). Alix interagirait de façon calcium dépendante, avec

le LBPA, via une boucle flexible hydrophobe qui change de conformation quand Alix s'associe à la membrane de l'endosome (Bissig et al., 2013). L'association d'Alix avec CHMP4 serait aussi impliquée dans la régulation de ce processus de back-fusion (Bissig et al., 2013).

1.3.3 L'endosome multivésiculé (EMV)

Les premières observations d'endosomes multivésiculés (EMV) en microscopie électronique datent des années 1950 (Pallade 1955 ; Sotelo and Porter., 1959). Cependant, ce n'est que bien plus tard que l'EMV a été associé à la voie endocytaire (Gorden et al., 1978 ; Felder et al., 1990). L'existence d'intermédiaires multivésiculés entre les endosomes précoces et les lysosomes est alors rapportée (Gruenberg et al., 1989). Les EMV sont des compartiments acides (pH : 6) de taille homogène, mesurant environ 500 nm de diamètre et qui sont remplis d'ILV d'une taille comprise entre 50 et 100 nm (Klumperman and Raposo, 2014). Les EMV sont enrichis en hydrolases ainsi qu'en marqueur Lamp1 (Lysosomal-associated membrane protein 1), une protéine qui rend la membrane limitante de l'endosome résistante aux hydrolases (Huotari and Helenius, 2011). De plus, les EMV sont fortement enrichis en LBPA (Matsuo et al., 2004 ; Falguière et al., 2008). La dynamique des EMV au sein de la cellule est due à leur association avec la dynéine, un moteur moléculaire qui les ancre sur les microtubules. Le cytosquelette d'actine joue également un rôle dans cette mobilité (Woodman et al., 2008). Tout au long de cette migration vers la région périnucléaire, les EMV accumulent des ILV ce qui leur donne un aspect caractéristique en microscopie électronique (Klumperman and Raposo, 2014).

L'EMV provient de la partie vacuolaire de l'EE, qui n'a pas la même composition moléculaire que les parties tubulaires. La formation de l'EMV est précédée par le recrutement progressif de la protéine Rab7-GTP par Rab5-GTP au niveau de sa partie vacuolaire (Rink et al., 2005 ; Vonderheit and Helenius., 2005). La façon dont l'EE perd ses parties tubulaires lors de ce processus n'est pas très bien comprise. Dans la littérature, deux hypothèses sont décrites afin d'expliquer ce phénomène. La première stipule qu'une fois que la conversion de Rab5 par Rab7 est achevée et que toutes les molécules de Rab5 sont dissociées de l'endosome, l'EE a mûri en EMV (Huotari and Helenius, 2011)(théorie de maturation).

La seconde hypothèse, pour expliquer la perte des parties tubulaires de l'EE, propose quant à elle, que le domaine vacuolaire de l'EE, seraient individualisés des parties tubulaires par un mécanisme de fission (Gruenberg et Stenmark 2004 ; Scott et al., 2014) impliquant potentiellement la dynamine (Mesaki et al., 2011). Ce processus conduirait à la formation, à

partir de l'EE, d'un EMV capable d'aller fusionner avec des compartiments plus tradifs (Scott et al., 2014).

Il a été proposé que les deux théories de la formation des EMV coexistent dans la cellule. En effet, les EMV, issus du mécanisme de fission de l'EE, seraient plutôt retrouvés à proximité de la membrane plasmique, alors que les EE plus proches du noyau auraient préférentiellement tendance à maturer en EMV (Huotari et al., 2011). Cependant, il est de plus en plus admis que la distinction, entre endosomes précoces et EMV, doit être vue comme un continuum plutôt qu'une série d'étapes distinctes (Figure 32). La voie endosomale est donc constituée d'un remodelage dynamique des compartiments endocytaires, conjointement avec une maturation et une acidification progressive de l'espace intra-endosomal.

Une fois formés, les EMV ont la capacité de fusionner avec le lysosome, où la dégradation de leurs contenus aura lieu. En marge de cette voie classique de dégradation, il a été montré que les EMV peuvent également fusionner avec la membrane plasmique, permettant la libération des ILV, qui, une fois dans le milieu extracellulaire, sont appelées exosomes. Les exosomes pourraient jouer un rôle important pour la communication entre les cellules en permettant l'échange de molécules (ARN, protéines...) (Vlassov et al., 2012).

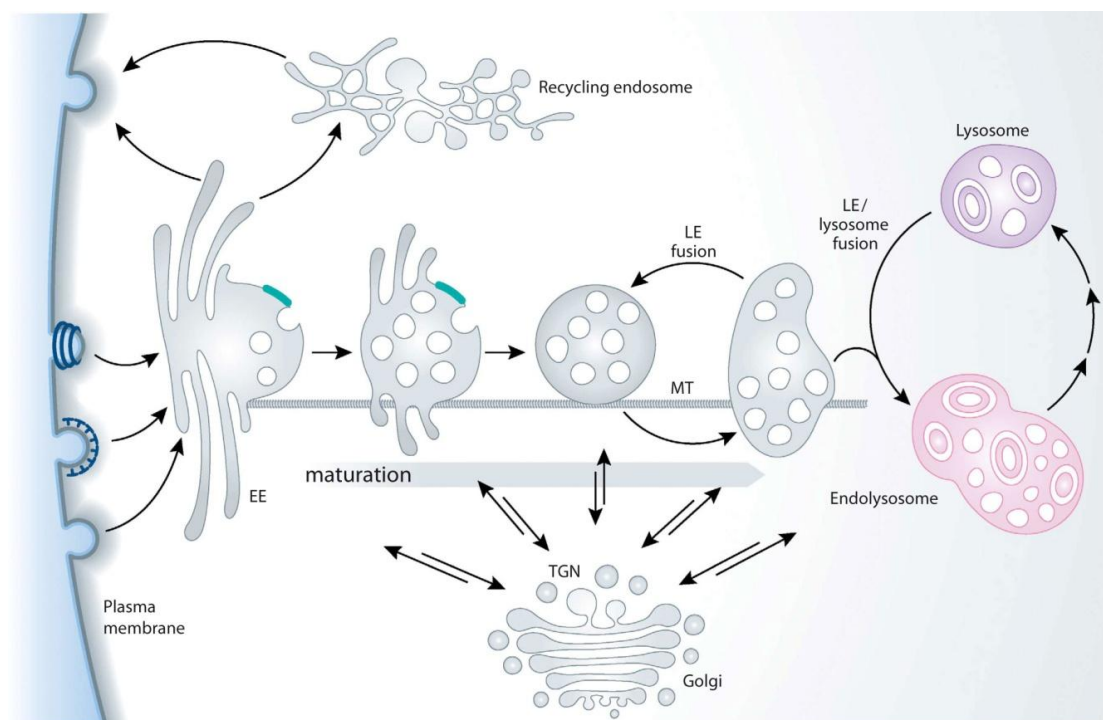


Figure 32 : Maturation des compartiments de la voie endolysosomale

Les vésicules en provenance de la membrane plasmique vont fusionner avec l'EE, où le tri entre recyclage et dégradation a lieu. La partie vacuolaire de l'EE qui contient des ILV va maturer en MVB. L'EMV accumule des ILV lors de sa migration le long des microtubules. L'EMV va pouvoir fusionner avec le lysosome et son contenu sera dégradé. Adapté de Huotari and Helenius, 2011

1.3.4 Le lysosome

Le lysosome est le compartiment final de la voie de dégradation et se caractérise par une forme sphérique et un diamètre compris entre 200 nm et 1 μ m (Bainton 1981). Son contenu est typiquement dense aux électrons, ce qui reflète une concentration importante en protéines. D'un point de vue moléculaire, il est difficile de distinguer le lysosome de l'endosome tardif, car les mêmes protéines sont présentes sur ces deux compartiments (Scott et al., 2014).

Les lysosomes sont des compartiments acides dont le pH est maintenu entre 3,5 et 5 par la présence, au niveau de leur membrane, de pompes à protons et de canaux ioniques. Ce pH très acide est indispensable au fonctionnement des hydrolases acides contenues dans le lysosome et permet ainsi la dégradation du matériel séquestré (Luzio et al., 2007). Dans de nombreux type cellulaire, cette dégradation entraîne l'accumulation de couches concentriques de membrane, ce qui est à l'origine du terme corps multi-lamellaires qui désigne également le lysosome.

La fonction de dégradation du lysosome est associée à l'arrêt de la signalisation des récepteurs induite par leurs stimulations à la membrane plasmique. De ce fait, des dérégulations de l'endocytose, à différentes étapes, sont retrouvées dans de nombreuses pathologies.

1.5 Endocytose et pathologies

Comme il l'a été mentionné précédemment, l'endocytose est particulièrement importante pour le contrôle de l'activité des récepteurs aux facteurs de croissances en permettant notamment l'arrêt de leur signalisation mais aussi la formation de plateformes de signalisation à la surface des endosomes. L'endocytose permet, de ce fait, de réguler finement de nombreux processus cellulaires tels que la signalisation, l'adhésion, la migration, l'absorption de nutriments par la cellule ou encore la transmission synaptique (Doherty et al., 2009).

Du fait de son importance dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, l'endocytose a été observée dérégulée dans de nombreuses pathologies (Aridor et al., 2002).

Ainsi, un dysfonctionnement de l'endocytose, est retrouvée dans de nombreux cancers (Parachoniak, Park 2012). Ce dysfonctionnement est associé à des mutations ou des modifications de l'expression de protéines contrôlant l'endocytose. Ainsi, la clathrine est mutée dans des cancers myo fibroblastiques inflammatoires (Bridge et al., 2001), la cavéoline 1 est sous exprimée ou mutée dans le cancer du sein, de l'ovaire ou du foie ou sur exprimée dans le cancer du pancréas ou de l'œsophage (Goetz et al., 2008). L'expression de la dynamine est quand à elle augmentée dans le cancer du pancréas ou diminuée dans le cancer du col de l'utérus (Mellman and Yarden, 2013).

Dans d'autres cancers, les récepteurs transmembranaires, tel que l'EGFR, peuvent être mutés ou dérégulés, ce qui a pour effet d'altérer leur trafic et donc leur activité (Lemmon and Schlessinger., 2010). Ainsi, une grande proportion de tumeurs gliales expriment l'EGFR-vIII (Mellman and Yarden, 2013), un mutant constitutivement actif délété des exons 2 et 7. Ce mutant, présente une diminution de son endocytose ainsi qu'un défaut de tri au niveau de l'EE, qui est associé à un recyclage exagéré du récepteur (Grandal et al., 2007). La combinaison de ces anomalies fait que l'activité de ce mutant est beaucoup plus importante que celle de l'EGFR ce qui est associé à une prolifération anarchique des cellules.

Enfin, l'endocytose régule directement la migration et l'étalement des cellules, notamment en contrôlant l'expression de protéines d'adhésion à la surface cellulaire. La perte du contrôle de ces processus cellulaires est un élément important de la carcinogénèse puisqu'il augmente le pouvoir invasif des cellules (Mellman and Yarden, 2013).

Les protéines de la machinerie ESCRT qui sont comme nous l'avons vu, des éléments importants de la formation des ILV au niveau des MVB, ont également été impliquées dans un grand nombre de pathologies (Saksenas et Emr, 2009 ; Stuffers et al., 2009) dont différents types de cancers. Ainsi, la protéine Tsg101 (ESCRT-I) a été initialement identifiée comme un suppresseur de tumeur chez la souris puisque l'implantation de cellules déficientes en Tsg101 entraîne la formation de tumeurs métastatiques dans des souris nues (Li L et al. , 1996). De plus, plusieurs gènes codant pour des protéines ESCRT ont été identifiés dans des criblages de gènes suppresseurs de tumeurs chez la drosophile (Rusten TE et al., 2007 ; Moberg KH et al., 2005 ; Vaccari T et al., 2005).

Des anomalies de l'endocytose ne sont pas retrouvées exclusivement associées aux cancers. Plusieurs maladies neurodégénératives sont liées à des mutations des protéines qui contrôlent la voie endolysosomale et des anomalies de cette voie ont été décrites dans les neurones malades (Lambert et al., 2013). Ces défauts de l'endocytose et du trafic endosomal, conduirait à l'accumulation de protéines anormales et à la formation d'agrégats toxiques pour le neurone

(Doherty et McMahon, 2009). Dans plusieurs maladies neurodégénératives, comme dans Alzheimer, ou la maladie de Neimann-Pick de type C, des endosomes abhérants sont retrouvés dans les neurones de patients, reflétant des problèmes de trafic endocytaire (Nixon, 2005). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, le peptide toxique A β (β -amyloïde) est un fragment de la protéine transmembranaire APP (Amyloid Precursor Protein) en partie produit au sein des endosomes. L'A β est le résultat de l'activité de deux protéases qui clivent l'APP ; la γ secretase à la membrane plasmique et la β secretase au sein de l'endosome. C'est lors de ce dernier clivage, au sein de l'endosome, que va être produit le peptide A β , qui après accumulation sous forme de plaques, est toxique pour la cellule. Il a été montré que la diminution du temps de résidence de l'APP à la membrane plasmique et donc une augmentation de son endocytose favorise la production du peptide A β (Perez et al., 1999).

Certaines sous unités d'ESCRT sont aussi reliées à des maladies neurodégénératives (Rollinson et al., 2009 ; Lee et al., 2012 ; Tanikawa et al., 2012 ; Rusten et al., 2012). Ainsi, des mutations de CHMP2B sont retrouvées chez des patients atteints de démence frontotemporale (Skibinski et al., 2005) et de sclérose latérale amyotrophique (Parkinson et al., 2006). D'autres exemples sont donnés par Tsg101 et Hrs qui sont impliquées dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Shirk et al., 2005 ; Lee et al., 2012), une maladie qui touche les nerfs périphériques. Dans tout les cas, des mutations ou des dérégulations de l'expression des protéines ESCRT semblent entraîner l'accumulation d'agrégats protéiques toxique pour le neurone.

2. La protéine Alix

La protéine Alix (Alg-2 Interacting protein X) ou AIP1 (Apoptosis Interacting Protein 1) a été identifiée en 1999, comme étant un partenaire de la protéine Alg-2 (Apoptosis Link Gene 2) , une calci-protéine impliquée dans la mort cellulaire programmée calcium dépendante (Missotten et al., 1999 ; Vito et al., 1999). Depuis, Alix a été décrite comme une protéine adaptatrice ayant de nombreux partenaires et a, de ce fait, été impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que l'endocytose, l'organisation du cytosquelette d'actine, le budding des virus, l'apoptose, la cytokinèse et la réparation de la membrane plasmique. Cependant la fonction précise de la protéine Alix dans ces processus reste, à l'heure actuelle, peu caractérisée.

2.1 Structure et sites d'interaction de la protéine Alix

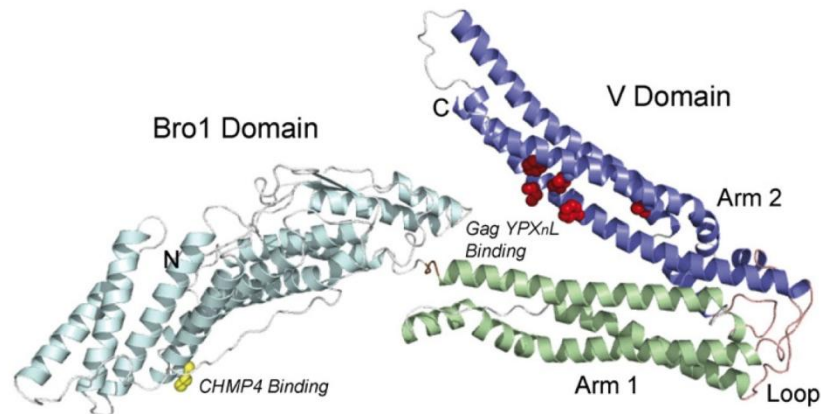
Alix est une protéine cytoplasmique de 868 acides aminés, constituée de 3 principaux domaines : le domaine Bro1 en position N-terminale, le V-domaine central qui comme son nom l'indique a une structure en V et un domaine C terminal riche en proline (Proline Rich Domain, PRD) (Figure 32). La protéine Alix se lie à Alg-2 via le domaine PRD, qui contient de nombreux sites d'interactions avec d'autres partenaires. En effet, ce domaine PRD est composé notamment de plusieurs motifs P748xRPPPP761, permettant la liaison d'Alix avec les domaines SH3 de CIN-85 (Chen et al., 2000) et des endophilines A1, A2 et A3 (Chatellard et al., 2002). On retrouve également, dans ce domaine PRD, un motif P[T/S]AP qui permet à Alix d'interagir avec la protéine Tsg101, une sous unité du complexe ESCRT-I (Strack et al., 2003) ainsi que deux motifs PPXY (723-726 ; 835-838), des séquences consensus pour l'interaction avec l'ubiquitine ligase Nedd-4.

Le domaine central d'Alix, le V domaine, est constitué de onze hélices α qui forment deux bras en forme de V permettant la dimérisation de la protéine en position tête-bêche. On retrouve au sein du V domaine le motif de liaison à la séquence YPXL de la protéine virale GAG (Pires et al., 2009). Ce domaine permet également à Alix d'interagir avec PAR1 (Protease Activated Receptor 1) (Dorres et al., 2012), l'ubiquitine (Dowlatsahi et al., 2012) ainsi qu'avec la syntenine (Baietti et al., 2012) (Figure 32B).

Enfin, en position N-terminale de la protéine Alix, se trouve le domaine Bro1 de forme allongée et recourbée, similaire au domaine BAR impliqué dans l'induction et la détection des courbures membranaires. Cependant, aucune fonction d'Alix dans la courbure membranaire n'a été rapportée (Pires et al., 2009). Ce domaine Bro1 permet à Alix de lier les protéines CHMP4 (A, B et C) du complexe ESCRT-III (Katoh et al., 2003). De plus, le domaine Bro1 d'Alix contient un site d'interaction avec le LBPA en position 212 ainsi qu'un site d'interaction avec le calcium en position 178 (Lyso BiPhosphatidic Acid) (Bissig et al., 2013) (Figure 32B). Alix est également capable d'interagir avec la Galectin-3 (Chen et al., 2009) une lectine impliquée dans la CIE, bien que ce site d'interaction n'a pas encore été caractérisé. En plus de ces nombreux partenaires impliqués dans la voie endolysosomale (Sadoul et al., 2006), Alix peut également interagir avec Src, un proto-oncogène impliqué dans le développement, la survie et la croissance cellulaire (Schmidt et al., 2005). Le domaine Bro1 d'Alix contient en effet, à son extrémité C-terminale, une tyrosine (319) capable de lier le domaine SH2 de l'oncoprotéine Src et d'induire la phosphorylation d'Alix. De plus, une tyrosine en position 527 d'Alix peut lier le domaine SH3 de Src, ayant pour effet la phosphorylation de plusieurs tyrosines en positions C-terminale (Schmidt et al., 2005). Il a été proposé que cette phosphorylation permettrait de moduler l'activité de liaison d'Alix avec ses

partenaires (Schmidt et al., 2004). Alix a également la capacité de lier l'actine et des régulateurs de sa polymérisation comme la cortactine ou de son organisation comme l' α -actinine (Pan et al., 2006). Enfin, Alix interagit avec CEP55 (Centrosomal Protein of 55kD), une protéine impliquée dans la cytokinèse.

A



B

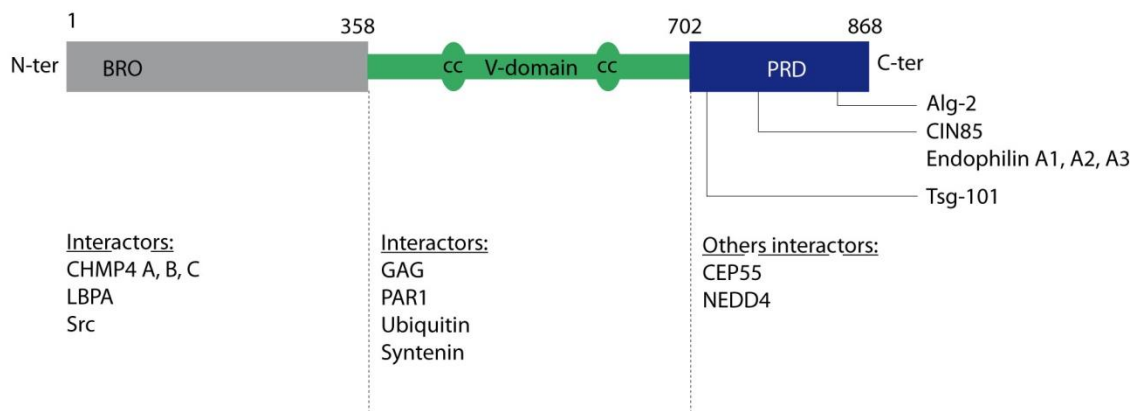


Figure 32 : Structure moléculaire du V-domaine et du domaine PRD d'Alix et représentation schématique d'Alix et des protéines qu'elle lie

A) Le domaine Bro1, en N-ter, a une forme allongée et recourbée. Le V-domaine, central, a une structure en V est permet la dimérisation d'Alix en position tête bêche. Le domaine PRD est peu structuré et n'est pas représenté. Adapté de Fisher et al., 2007

B) Alix est composée de 868 acides aminés chez la souris et peut lier de nombreuses protéines.

2.2 Partenaires et fonctions d'Alix

2.2.1 La formation des ILV

Comme nous venons de le voir, de nombreux partenaires de la protéine Alix sont impliqués dans la voie endolysosomale. Plusieurs études ont impliqué Alix dans différentes étapes de la

voie endocytaire et notamment dans la formation des ILV. Pourtant, à l'heure actuelle, la fonction précise d'Alix dans ce processus n'est pas clairement définie.

2.2.1.1 Alix et les ESCRT

Que ce soit chez la levure ou chez les mammifères, il a clairement été démontré que les complexes ESCRT sont impliqués dans la formation des ILV et donc dans le tri des récepteurs ubiquitinés vers la voie de dégradation. Des modèles *in vitro* ont montré qu'ESCRT 0 lie et séquestre les cargos ubiquitinés via un domaine de liaison à l'ubiquitine, ESCRT I et II initie ensuite la formation de l'ILV et ESCRT III en polymérisant entraîne la fission de la vésicule. Bro1, l'homologue d'Alix chez la levure, permet de recruter la déubiquitinase Doa4 (Deubiquitinating enzyme 4), sur le complexe ESCRT III (Luhtala and Odorizzi, 2004), entraînant la dé-ubiquitination du cargo, une étape tardive mais nécessaire pour la formation des ILV. Chez la levure, on sait que Bro1 est indispensable pour la dégradation des récepteurs puisque sa déplétion entraîne l'accumulation de protéines ubiquitinées à la surface de l'endosome (Springael et al., 2002). Chez les mammifères, bien qu'Alix interagisse avec ESCRT I et ESCRT III, sa fonction dans le tri des récepteurs est moins évidente, puisque la déplétion d'Alix n'a pas d'effet majeur sur la dégradation de l'EGFR (Schmidt et al., 2004, Schmidt et al., 2005, Cabezas et al., 2005, Bowers et al., 2006 ; Luyet et al., 2008 ; Doyotte et al., 2008) et qu'aucun rôle d'Alix dans la dé-ubiquitination des récepteurs n'a été rapporté (Bissig et al., 2013). Alix et Bro1 ne présentent que 22% d'homologie et ont de ce fait des propriétés différentes (Sadoul et al., 2006). L'implication mineure d'Alix dans le tri des récepteurs pourrait être due au fait que HDPTP (His Domain PhosphoTyrosine Phosphatase), un homologue d'Alix, semble remplir cette fonction puisque sa déplétion inhibe de façon majeure, la dégradation de l'EGFR et la formation des ILV (Doyotte et al., 2008). Il a donc été proposé la fonction de Bro1 dans le tri des récepteurs chez la levure serait assurée par HDPTP plutôt que par Alix chez les mammifères. En dépit d'une nette implication d'Alix dans le tri des récepteurs ubiquitinés, il a été rapporté qu'Alix pourrait réguler de manière ESCRT dépendante mais ubiquitine indépendante, le tri de PAR1 un récepteur de la thrombine couplé aux protéines G (Dores et al., 2012). Alix permettrait ainsi de faire le lien entre le récepteur et la machinerie ESCRT III.

Il a récemment été observé que la déplétion d'Alix ralentie (sans la bloquer) la dégradation de l'EGFR et que cet effet est plus fort lors d'une stimulation continue à l'EGF que lors d'un pulse-chase à l'EGF (Sun et al., 2014). Selon les auteurs, cette différence entre la stimulation

continue et le pulse-chase pourrait expliquer pourquoi aucun effet de la déplétion d'Alix sur la dégradation de l'EGFR n'a été observé dans les études antérieures. En effet, lors d'expériences de pulse-chase à l'EGF, l'inhibition de la dégradation de l'EGFR par la déplétion d'Alix n'est visible que pendant la première heure de stimulation à l'EGF (Sun et al., 2014).

Enfin, les auteurs de cette étude ont montré que la stimulation de l'EGFR par l'EGF induit l'interaction d'Alix, au niveau de son V-domaine, avec le récepteur ubiquitinylé, la dimérisation d'Alix et l'augmentation de l'interaction d'Alix avec CHMP4 au niveau de l'endosome. L'inhibition, de l'interaction d'Alix avec CHMP4, de la dimérisation d'Alix ou son extinction ralentissent la dégradation de l'EGFR et prolongent sa signalisation. Cette étude démontre donc pour la première fois un rôle d'Alix dans le tri de l'EGFR (Sun et al., 2014).

2.2.1.2 Alix et le LBPA

La protéine Alix a été décrite comme étant un partenaire du LBPA, un phospholipide impliqué dans la formation des ILV au niveau des EMV (Kobayashi et al., 1998 ; Matsuo et al., 2004 ; Chevallier et al., 2008 ; Bissig et al., 2013). *In vitro*, des liposomes préparés à partir de LBPA forment spontanément des vésicules internes comparables aux ILV des EMV (Matsuo et al., 2004). Alix est capable de s'associer aux liposomes contenant du LBPA et d'inhiber fortement la formation de ces vésicules (Matsuo et al., 2004). De plus, dans les cellules, l'extinction de l'expression d'Alix par des siRNA est suffisante pour diminuer l'expression du LBPA et la présence de cholestérol au niveau des EMV, ainsi que le nombre d'EMV contenant des ILV (Matsuo et al., 2004 ; Chevallier et al., 2008). La protéine Alix pourrait donc moduler la formation des ILV en régulant la présence à la fois du LBPA et du cholestérol à la membrane des endosomes.

Il est important de noter que la relation entre Alix et le LBPA est spécifique des eucaryotes supérieurs, le LBPA n'étant pas présent chez la levure.

L'implication du couple Alix/LBPA dans la formation des ILV n'est pas nécessairement à relier à l'interaction d'Alix avec les ESCRTs. Différentes études suggèrent qu'il existe plusieurs populations distinctes d'ILV. En effet, les EE sont dépourvus de LBPA, sont enrichis en protéines ESCRT et présentent des ILV (Gruenberg and Stenmark, 2004 ; Woodman, 2009). De plus, plusieurs populations d'EMV ont été décrites. Ainsi, White et al ont montré, que la population d'EMV contenant le récepteur à l'EGF à la surface des ILV

n'est pas la même que la population d'EMV marquée par un anticorps dirigé contre le LBPA (White et al., 2006).

Il a été proposé que l'interaction entre Alix et le LBPA serait importante pour réguler le processus de back fusion, qui permet à l'ILV de fusionner avec la membrane de l'endosome et libérer dans le cytosol, certains composants n'étant pas destinés à être dégradés. La back fusion n'a été observée que dans les endosomes contenant du LBPA (Bissig and Gruenberg, 2013) et ce processus permettrait aux ARN viraux, lipides ou autres protéines de rejoindre le cytoplasme en évitant la dégradation dans le lysosome. La back fusion est notamment utilisée pour l'infection de la cellule par certains pathogènes comme le virus de la stomatite vésiculaire (Leblanc et al., 2005 ; Luyet et al., 2008 ; Bissig et al., 2013), le virus de lassa (Pasqual et al., 2011) ou encore la toxine de l'anthrax (Abrami et al., 2013). L'inhibition de l'interaction d'Alix avec le LBPA ou avec CHMP4 est suffisante pour diminuer la back fusion et donc l'infection de la cellule hôte (Bissig et al., 2013). Cependant, le mécanisme exact de la back fusion n'est pas encore connu. L'hypothèse la plus probable est qu'Alix et le LBPA forment des microdomaines à la membrane de l'ILV et de l'endosome, ce qui permettrait un phénomène de « kiss and run » de l'ILV (Bissig and Gruenberg, 2013). Alix interagit, via son domaine Bro1, avec le LBPA et la présence de calcium est nécessaire pour rendre le site accessible (Bissig et al., 2013). Après sa liaison au LBPA, Alix change de conformation et insère partiellement une boucle hydrophobe dans le feuillet cytoplasmique de la membrane endosomale (Bissig et al., 2013). Ce phénomène pourrait créer une asymétrie locale de la membrane et favoriser ainsi la fusion de l'ILV avec la membrane de l'endosome (Bissig et al., 2013). De plus, cette insertion partielle d'Alix dans la membrane endosomale pourrait écarter les glycoprotéines (glycocalyx) qui y sont enchâssées et ainsi créer un espace permettant à l'ILV de fusionner avec la membrane endosomale (Bissig and Gruenberg, 2013) (Figure 33). La balance entre formation d'ILV et back fusion serait importante pour maintenir l'homéostasie de l'endosome et, de ce fait, l'influence des ESCRT sur la back fusion serait indirecte.

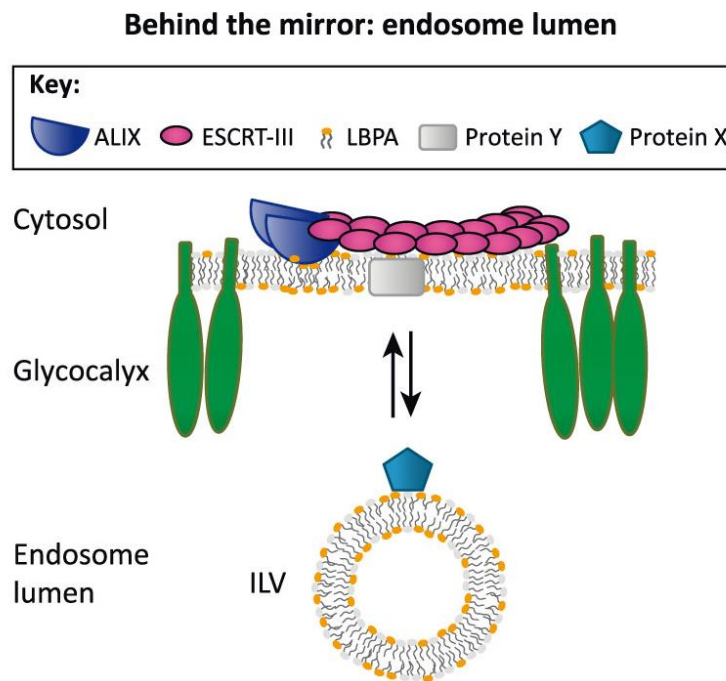


Figure 33 : Modèle du rôle d’Alix et du LBPA dans le processus de back fusion de l’ILV avec la membrane du MVB

L’interaction d’Alix avec le LBPA entraîne l’insertion d’une boucle hydrophobe d’Alix dans la membrane endosomale. Ce phénomène pourrait permettre de « dégager » la membrane de l’endosome, notamment en poussant les glycoprotéines (glycocalyx), et favoriser ainsi la fusion de l’ILV. Adapté de Bissing and Gruenberg, 2013

3.2.2.3 Alix et la syndécan, synténine

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires issues du relargage des ILV suite à la fusion du MVB avec la membrane plasmique (Figure 34). Alix est de ce fait associée aux exosomes et est utilisée comme marqueur de ces vésicules. Il a récemment été publié qu’Alix intervient dans la biogénèse des exosomes et donc des ILV, au sein d’un complexe tripartite syndécan-synténine-Alix (Baietti et al., 2012). Les syndécans sont des protéines transmembranaires ubiquitaires couplées aux sulfates d’héparane de manière covalente. Le sulfate d’héparane étant un glycosaminoglycane (GAG) de la matrice extracellulaire, le couple syndécan-sulfate d’héparane forme un protéoglycane. Les syndécans interagissent aussi avec la synténine, une protéine cytosolique qui se fixe au V-domaine d’Alix via son extrémité N-terminale. Dans cette étude, il a été montré que syndécan, synténine et Alix se retrouvent dans les exosomes (identifiés avec CD63 et Hsp70). De plus, la surexpression de la synténine augmente la

sécrétion d'exosomes de manière dépendante d'Alix, alors que la déplétion des syndécanes, d'Alix ou de la synténine provoque une diminution du relargage d'exosomes (inhibition de la biogénèse des ILV). Dans cette étude, les auteurs ont également rapporté l'existence d'une sous-population d'exosomes marqués par la Flotilline-1 dont la biogénèse n'est pas dépendante du complexe Alix-synténine-syndécane.

Enfin, cette étude montre que CHMP4B (ESCRT III) serait recruté, via Alix, pour induire la vésiculation de la membrane endosomale, et que la scission de l'ILV nécessiterait VPS4.

Il a été proposé que la formation des ILV contenant Alix/syndécane/synténine est régulée par Arf6 (ADP ribosylation factor 6) et un de ces effecteurs, PLD2 (Phospholipase D2). En effet, la déplétion de ces protéines diminue significativement le relargage d'exosomes contenant Alix/syndécane/synténine (Ghossoub et al., 2014).

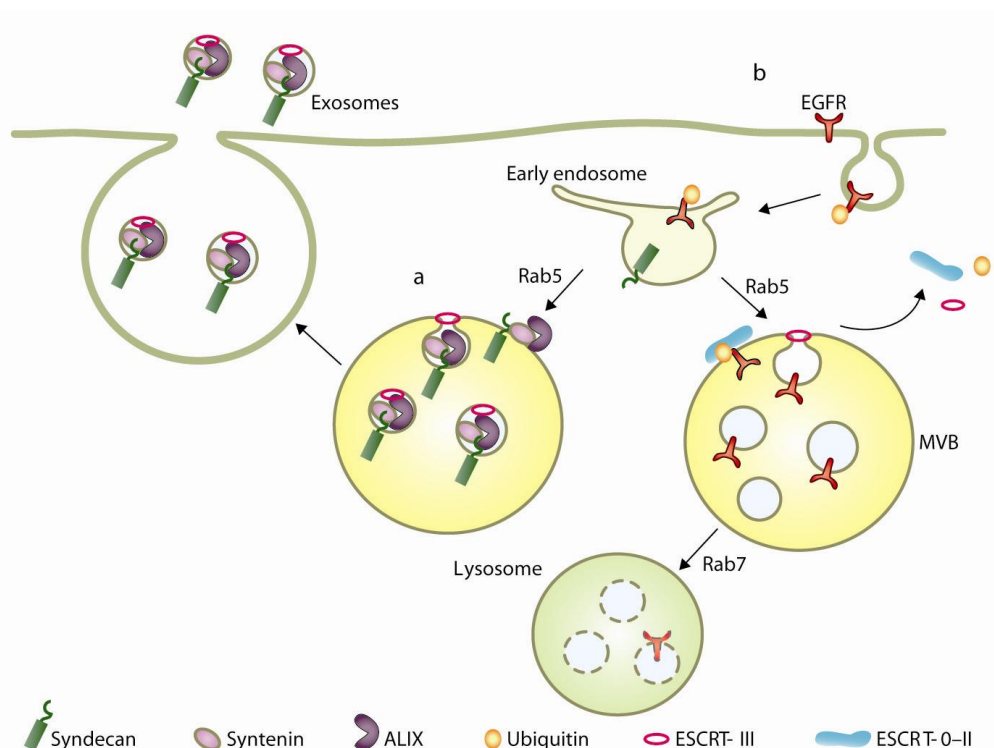


Figure 34 : Modèle de la formation des ILV par Alix/syndécane/synténine

Le complexe Alix/synténine/syndécane serait à l'origine de la formation d'une population d'ILV (et donc d'exosome) dépendante d'ESCRT III. Dans ce modèle, Alix n'interviendrait pas dans la formation des ILV dépendante d'ESCRT 0 et d'ESCRT II.

Adapté de Hurley and Odorizzi, 2012

2.2.2 Alix et l'internalisation

2.2.1.1 Alix et CIN85

Comme nous l'avons vu, le domaine PRD d'Alix contient un site d'interaction avec le domaine SH3 de CIN85 (aussi connue sous le nom de SETA ou de Ruk), une protéine impliquée dans l'endocytose des récepteurs aux facteurs de croissance de type tyrosine kinase (Petrelli et al., 2002 ; Soubeyran et al., 2002). CIN85 est une protéine adaptatrice qui est également capable d'interagir avec les endophilines et la présence de domaines coiled-coiled permettent son oligomérisation (Odorizzi, 2006). CIN85 a d'abord été caractérisée comme un interacteur de Cbl, une protéine à activité ubiquitine ligase de type « RING Finger ». Cbl se lie au récepteur activé, comme l'EGFR, via les résidus tyrosines phosphorylées du récepteur et est en retour phosphorylé par le récepteur (Thien and Langdon, 2001). Cette phosphorylation permet alors le recrutement de CIN85 qui est constitutivement associé aux endophilines et ce complexe (CIN85/Cbl/endophiline/EGFR phosphorylé) entraîne l'endocytose du récepteur stimulé (Figure 35). Cbl agit également en catalysant l'ajout de molécules d'ubiquitine sur le récepteur, ce qui le dirige, vers la voie de dégradation endo-lysosomale (Szymkiewicz et al., 2002).

Les travaux de Schmidt ont montré que l'extinction de l'expression d'Alix par des siRNA est suffisante pour augmenter (faiblement) l'endocytose du récepteur à l'EGF (Schmidt et al., 2004). A l'inverse, la surexpression d'Alix est associée à une diminution de l'ubiquitination de l'EGFR ainsi que de son endocytose, suggérant que la surexpression d'Alix bloque l'interaction de Cbl avec CIN85 en séquestrant le couple CIN85-endophiline et en empêchant leur interaction avec Cbl (Schmidt et al., 2004) (Figure 35). Cependant, aucun effet d'Alix n'a été observé sur la dégradation du récepteur à l'EGF (Schmidt et al., 2004).

L'interaction d'Alix avec la protéine Src, semble pouvoir réguler la liaison de CIN85 à Alix. Src se lie à Alix au niveau de son domaine Bro1 et hyperphosphoryle plusieurs tyrosines d'Alix. Sous cette forme, Alix perd la capacité de lier CIN85 et se relocalise alors dans le cytosol (Schmidt et al., 2005).

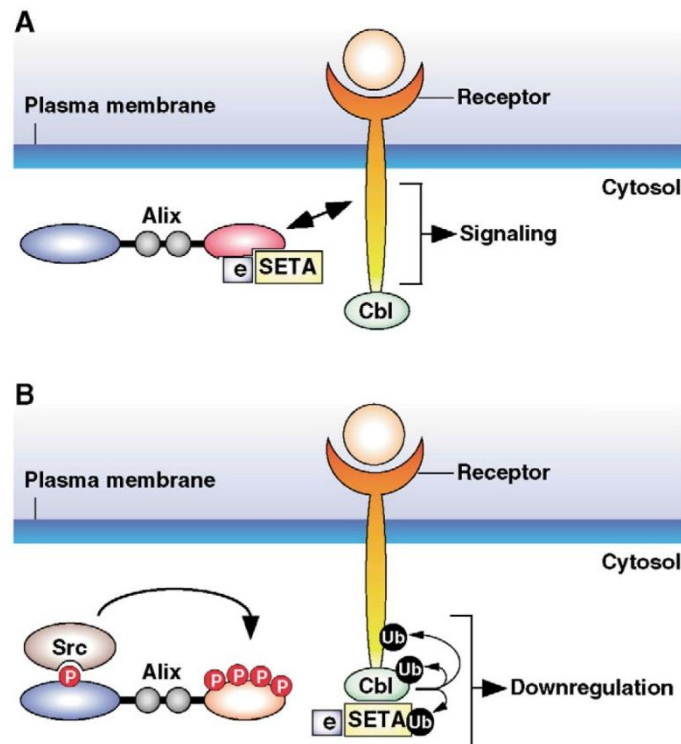


Figure 35 : Modèle du rôle d'Alix dans l'endocytose de l'EGFR

A. Alix inhibe l'association du complexe endophiline/CIN85 (SETA) avec Cbl. Cbl n'a alors plus la capacité de s'auto-ubiquitiner ni d'ubiquitiner le récepteur et CIN85. Le récepteur n'est alors plus internalisé et sa voie de signalisation n'est plus régulée.

B. En phosphorylant Alix, Src empêche sa liaison au complexe endophilines/CIN85. Ce complexe se retrouve alors libre d'interagir avec Cbl permettant ainsi l'internalisation du récepteur. Adapté d'Odorizzi et al., 2006

e: endophiline; ub : ubiquitine

2.2.1.2 Alix et la Galectine-3

Des études en double hybride ont montré une interaction directe entre Alix et la Galectine-3 et rapporté un rôle de la Galectine-3 intracellulaire dans l'internalisation des récepteurs de cellules T (TCR)(Chen et al., 2009). La Galectin-3 est une lectine, capable de lier spécifiquement les β -galactosides et qui a la particularité d'être sécrétée, permettant sa présence aussi bien dans les cellules que dans le milieu extra-cellulaire. De façon intéressante, il est maintenant admis que les TCR peuvent être endocytés par CIE (Balagopalan et al., 2009). Ce mécanisme est peu caractérisé mais il semble dépendant de RhoG (Ras homology Growth-related) et de TC21 (Teratocarcinoma Oncogene) (Martinez Martin et al., 2011).

La Galectine-3 a également été impliquée dans l'endocytose de l'EGFR. En effet, une étude a montré que l'endocytose et le recyclage du récepteur sont affectés dans des cellules KO pour la Galectine-3 (Liu et al., 2012), ce qui entraîne un défaut de migration des kératinocytes.

Pour les auteurs, cet effet serait dû à la modulation de la liaison d'Alix à l'EGFR activé, via la Galectine-3, sans que le mécanisme moléculaire soit plus décrit. En effet, après stimulation par l'EGF, Alix est moins associée à l'EGFR dans les cellules ko Galectine-3 que dans des cellules wt. De façon intéressante, l'inhibition de l'endocytose de l'EGFR par la déplétion en Galectine-3 est bien plus importante à forte concentration d'EGF.

2.2.3 Alix et les endophilines

Notre laboratoire a montré qu'Alix est capable de lier le domaine SH3 des endophilines A 1,2 et 3 (l'endophiline A2 est l'isoforme ubiquitaire des endophilines A) via la séquence PxRPPPP située dans le domaine PRD de la protéine Alix (Chatellard-Causse et al., 2002). Différents mutants d'Alix, notamment la moitié C-terminale d'Alix (Alix-CT), sont capables de former des structures tubulo-vésiculaires intra cytoplasmiques, très denses en matériel. Ce phénomène de vacuolisation est augmenté par la co-expression d'Alix-CT et des endophilines (Chatellard-Causse et al., 2002). De façon intéressante, ces structures ne colocalisent pas avec les marqueurs classiques des différents compartiments de la voie endolysosomale tels que EEA1 un marqueur des endosomes précoces, ou LAMP1, un marqueur des endosomes tardifs. La fonction de cette interaction entre Alix et les endophilines est à l'heure actuelle encore inconnue.

2.2.4 Alix et la régulation du cytosquelette d'actine

Alix interagit avec la protéine FAK (Focal adhesion Kinase) ainsi qu'avec la protéine Pyk-2 (Protein tyrosine Kinase 2)(Schmidt et al., 2003 ; Schmidt et al., 2005) deux kinases impliquées dans la régulation de l'adhérence cellulaire. La modulation de la phosphorylation de ces kinases par Alix semble être associée à la modification de l'adhésion cellulaire. De plus, une interaction moléculaire entre Alix et différentes protéines du cytosquelette a été montrée par immunoprécipitation (l'actine, α -actinine, la cortactine, la tubuline et la GFAP) (Schmidt et al., 2003) (Cabezas et al., 2005) (Pan et al., 2006).

Alix interagit avec l'actine à la fois par son domaine Bro1 et son domaine PRD (Pan et al., 2006). L'extinction par des ARN interférant de l'expression d'Alix dans la lignée WI38 inhibe la formation des fibres de stress et diminue fortement l'interaction entre l' α -actinine et l'actine F suggérant un rôle d'Alix dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Pan et al., 2006). De plus, cette baisse de l'expression d'Alix inhibe le recrutement de la cortactine aux bords de la cellule. Plus récemment, une étude réalisée sur des fibres musculaires en culture, a

une nouvelle fois impliquée Alix dans l'organisation de l'actine. En effet, Alix interagit, et est ubiquitinée par Ozz-E3, une ubiquitine ligase spécifique des cellules musculaires. Cette ubiquitination permettrait de modifier la conformation d'Alix et de réguler le niveau d'expression de cortactine dans ces cellules et de ce fait, l'organisation du réseau d'actine. Dans des myotubes ko pour Ozz, le niveau d'actine filamenteuse est perturbé et Alix s'accumule avec la cortactine, dans des structures ponctiformes. La déplétion d'Alix dans des cellules musculaires affecte également le taux et la distribution d'actine filamenteuse ce qui a pour effet de d'altérer la morphologie des cellules, les protrusions du sarcolemme ainsi que la motilité cellulaire. Ces résultats suggèrent ainsi que Ozz-E3 pourrait réguler Alix aux sites de remodelage du cytosquelette d'actine (Bongiovanni et al., 2012).

Enfin, il a été montré qu'en absence d'Alix, les endosomes de recyclage et les endosomes précoces étaient relocalisés de la périphérie membranaire vers la région périnucléaire et que les cellules présentaient de plus des accumulations de structure anormales riches en actine, cortactine et clathrine (Cabezas et al., 2005). Il a été proposé qu'Alix pourrait donc faire un lien entre le cytosquelette et les endosomes, via son interaction avec l'actine et des protéines endocytaires mais sa fonction précise dans ce processus reste à déterminer.

2.2.5 Alix et le bourgeonnement des virus enveloppés

Les virus répliquent leur matériel génétique et produisent les protéines nécessaires à leur multiplication, en piratant les machineries moléculaires des cellules hôtes. Une fois assemblés, les virions doivent sortir de la cellule hôte pour en infecter de nouvelles et poursuivre le processus de multiplication. Il a été montré que certains virus, comme le VIH-1, détournent la machinerie ESCRT pour bourgeonner à la membrane plasmique (Von Schwedler et al., 2003). La protéine virale Gag permet de recruter les ESCRT au site de bourgeonnement. En effet les domaines YPxL et PTAP de la protéines Gag du VIH-1, permettent de recruter respectivement Alix et TSG-101 à la membrane plasmique (Strack et al., 2003 ; Garrus et al., 2001 ; Ku et al., 2014). Ces deux protéines permettent à leur tour le recrutement d'ESCRT III et de l'ATPase Vps4 au site de bourgeonnement viral (Morita and Sundquist, 2004; Bieniasz, 2009; Carlton and Martin-Serrano, 2007; Hurley and Hanson, 2010). Le mécanisme est mieux compris dans le cas d'Alix que de TSG-101. La liaison de la protéine Gag sur le domaine YPxL entraine un changement de conformation d'Alix (conformation ouverte) qui lui permet d'interagir avec CHMP4 et de la recruter au site de bourgeonnement (Zhou et al., 2010). Cette interaction active CHMP4 qui va alors polymériser et recruter CHMP2. Cette polymérisation d'ESCRT III va déformer la membrane plasmique

et ainsi permettre la sortie du virus (Saksena et al., 2009; Wollert et al., 2009; Guizetti et al., 2011). Il a été proposé qu'Alix pourrait permettre de recruter le complexe ESCRT-III sans impliquer ESCRT-II dans le bourgeonnement des virus (Figure 36).

Récemment, il a été montré que l'association d'Alix avec la protéine Gag serait facilitée par la Galectine-3 (Wang et al., 2014).

Alix a été également impliquée dans le bourgeonnement d'autres virus comme l'EIAV (Equine Infectious Anemia Virus), pour lequel il a été montré qu'Alix est recrutée précocement et durablement au site du bourgeonnement, juste après la mise en place de la protéine Gag (Jouvenet et al., 2011).

Enfin, il a été mis en évidence qu'Alix possède, dans le V-domaine, un site d'interaction avec des chaînes de plus de 3 ubiquitines présentes sur des résidus lysine et que la mutation de ce site d'interaction inhibe le bourgeonnement des lentivirus (Dowlathshahi et al., 2012).

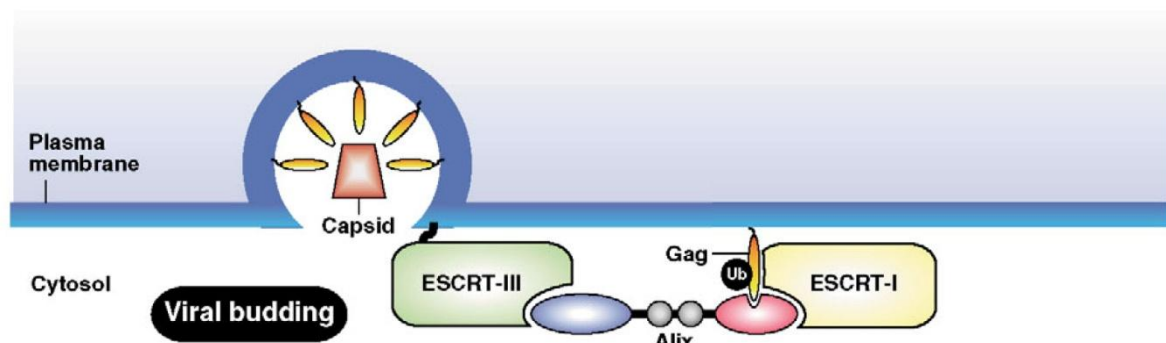


Figure 36 : Modèle du rôle d'Alix dans le bourgeonnement viral.

Alix interagit avec la protéine virale Gag et permet de faire le lien entre ESCRT I et ESCRT III sans passer par ESCRT II. Une fois à la membrane plasmique, ESCRT III en polymérisant déforme la membrane et permet la sortie des virions.

Adapté de Odorizzi, 2006

2.2.6 Alix et la cytokinèse

Dans les cellules animales, la mitose se termine par l'étape de cytokinèse qui consiste en la scission du pont membranaire entre les deux cellules filles. Le pont entre les deux cellules en division est maintenu en tube de 200 nm de diamètre par un anneau d'actomyosine (Green et al., 2012). Au sein de cette structure réside le midbody, qui est entre autre composé de microtubules compactés initialement présents pour ségréger les chromosomes (Hu et al., 2012).

L'étape de fission du pont est assurée par le complexe ESCRT-III qui est recruté par TSG-101 et Alix (Carlton et Martin-Serrano., 2007 ; Morita et al., 2007). TSG-101 et Alix sont elles même recrutées au midbody via leur interaction directe avec la protéine Cep55 (Centrosomal protein of 55 kDa). ESCRT-0 et ESCRT-II n'ont pas été impliquées dans la cytokinèse, Alix pourrait donc faire le lien (comme pour les virus) entre ESCRT-I et ESCRT-III, puisque l'interaction entre Alix et CHMP4 est requise pour l'abscission (Carlton et al., 2008, Eikenes et al., 2015).

Le mécanisme par lequel les protéines ESCRT participent à l'abscission est encore flou. ESCRT-III forme des anneaux sur la membrane plasmique, de part et d'autre du site de fission. Ces oligomères permettraient ainsi la constriction membranaire nécessaire à l'abscission. Cependant, à l'heure actuelle, des tests *in vitro* n'ont pas permis de mettre en évidence qu'Alix et Tsg101 puissent permettre la polymérisation d'ESCRT-III (Carlson and Hurley., 2012).

2.2.7 Alix et la mort cellulaire programée

Alix a été initialement caractérisée comme un partenaire moléculaire d'Alg-2, une protéine impliquée dans la mort cellulaire calcium dépendante.

Alg-2 est une protéine de 22 kDa, composée d'un domaine penta-EF (Maki et al., 2002). En présence de calcium, la protéine change de conformation, devient active, et peut aller se lier à d'autres protéines et réguler leurs activités (Jia et al., 2001). Alg-2 a été impliquée dans l'apoptose mais son rôle précis reste à ce jour inconnu (Vito et al., 1996 ; Lacana et al., 1997). En 2001, il a été montré que la surexpression d'HP95, l'orthologue humain d'Alix, bloque les cellules HeLa en phase G1 et induit leur apoptose (Wu et al., 2001 ; Wu et al., 2002). De plus, à la même période, CIN85 a été impliquée dans la mort des astrocytes induite par l'irradiation aux ultra-violets, fonction dépendante de la capacité de CIN85 à lier Alix et Alg-2 (Chen et al., 2000).

Plusieurs études réalisées au laboratoire ont également impliqué Alix dans l'apoptose. Ainsi, on a observé une augmentation de l'expression d'Alix dans les neurones apoptotiques de rat injecté avec du kaïnate (Hemming et al, 2004) ou dans des neurones striataux en dégénérescence causé par l'acide 3-nitropropionique (Blum et al., 2004). Il a aussi été montré que la surexpression d'Alix dans des CGN (neurones granulaires de cervelet) était suffisante pour induire une mort caspase dépendante (Trioulier et al., 2004) alors que la surexpression de mutants d'Alix est associée à une protection de la mort induite par une privation en facteurs trophiques.

Le TNFR1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1) est un récepteur qui peut, après fixation de son ligand (TNF α), déclencher la mort cellulaire programmée de la cellule suite à l'activation de la caspase 8, au niveau de l'endosome (signalling endosome). Nous avons pu montrer qu'Alix et Alg-2 interagissent avec la pro caspase 8 et forment un complexe avec le TNFR1, de manière dépendante de l'association d'Alix avec les ESCRT. De plus, des mutants d'Alix, comme Alix Δ PGY (protéine délétée du site d'interaction avec Alg-2) et Alix CT protègent les cellules HEK 293 et HeLa de la mort induite par le TNFR1 (Mahul-Mellier et al., 2008). Ces mêmes mutants bloquent également la mort cellulaire programmée des motoneurones au cours de l'embryogénèse du poulet. (Mahul-Mellier et al., 2006). Ainsi, un modèle a donc été proposé dans lequel Alix associé à Alg-2 permettent le recrutement et l'activation de la caspase 8 sur les endosomes contenant le TNFR1 (Mahul-Mellier et al., 2008) (Figure 37).

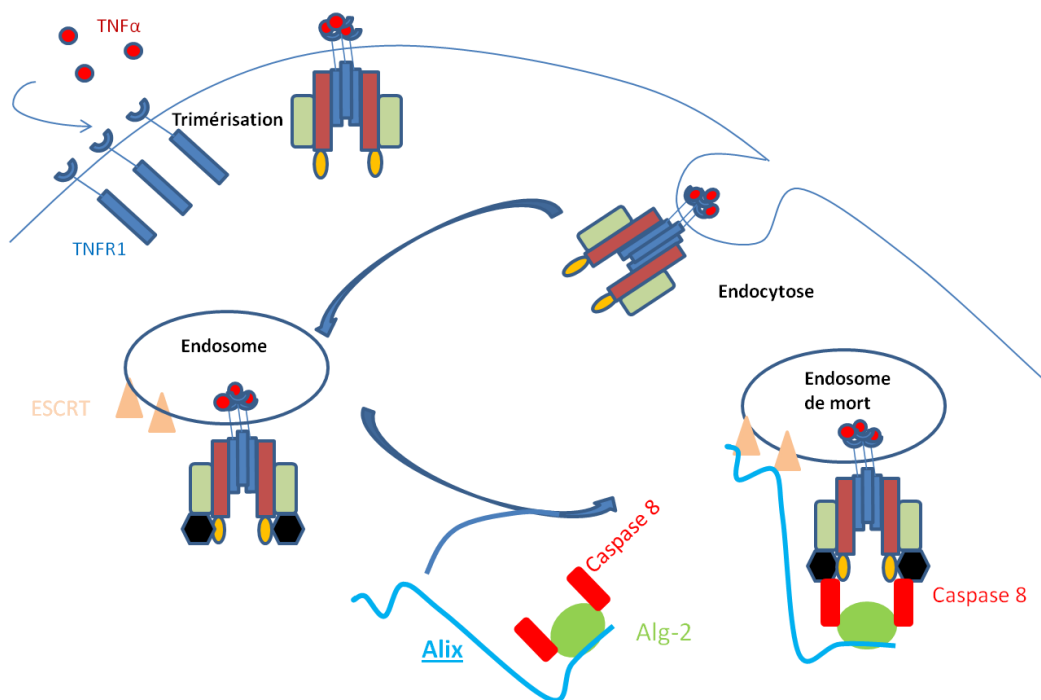


Figure 37 : Modèle du rôle d'Alix dans l'apoptose induite par le TNFR1

L'internalisation du TNFR1 est déclenchée par la fixation du TNF α et permet à l'ensemble du complexe de se retrouver d'être endocyté. Alix pourrait permettre l'adaptation de la pro-caspase 8, via son interaction avec ALG-2, sur le complexe TNFR1 située au niveau des endosomes. Cette interaction serait stabilisée par celle d'Alix avec les ESCRT présentes à la surface des endosomes.

2.2.8 Alix et l'autophagie

Le rôle d'Alix dans l'autophagie a été étudié du fait d'un lien direct entre l'endocytose et l'autophagie. L'autophagie est un mécanisme d'autolyse par lequel la cellule dégrade des composants de son cytoplasme via ses lysosomes. Ce processus participe à l'équilibre entre synthèse et dégradation et est de ce fait impliqué dans la croissance, le développement et l'homéostasie cellulaire. Il existe plusieurs formes d'autophagies, qui ont toutes pour finalité la dégradation du matériel cytosolique au sein du lysosome (Todde et al., 2009). L'autophagie la plus étudiée est la macro-autophagie qui est caractérisée par la formation d'une organelle à double membrane, l'autophagosome. L'autophagosome est capable de fusionner avec le lysosome afin de former un autolysosome, capable de dégrader le matériel séquestré. La macro-autophagie est régulée par une trentaine de protéines de la famille ATG (Autophagy related gene). La machinerie ESCRT semble impliquée dans la macro-autophagie induite par carence nutritive puisque l'expression de dominants négatifs, ou l'extinction de protéines des complexes ESCRT et de VPS4, induisent l'accumulation d'autophagosomes (Doyotte et al., 2005 ; Filimonenko et al., 2007 ; Lee et al., 2007 ; Rusten et al., 2007, Petiot et al., 2008). Des études réalisées au laboratoire ont montré que contrairement aux protéines ESCRT, Alix ne régulerait pas l'autophagie induite (Petiot et al., 2008).

Récemment, il a été montré qu'Alix pourrait jouer un rôle dans la macro-autophagie basale grâce à une interaction entre Alix et le complexe autophagique Atg12-Atg3 (Murrow et al., 2015). Comme dans les cellules déplétées en ATG12-ATG3, la déplétion d'Alix entraîne la relocalisation des endosomes tardifs et une inhibition de la macro-autophagie basale. De plus, les cellules déplétées en ATG12-ATG3 ou en protéine Alix, présentent une diminution de la sécrétion d'exosomes ainsi que du relargage de la protéine virale Gag. Pour les auteurs de cette étude, l'interaction entre ATG12-ATG3 et Alix serait donc nécessaire pour promouvoir, en plus de la macro-autophagie basale, le relargage d'exosomes, le bourgeonnement des virus et la trafic endolysosomal. Leur hypothèse est que cette interaction permettrait d'activer Alix par une conformation ouverte, ce qui lui permettrait d'interagir avec ses partenaires et d'assurer ainsi diverses fonctions cellulaires (Murrow et al., 2015).

2.2.9 Alix et la réparation membranaire

Récemment, Alix et les ESCRT ont été impliqués dans le phénomène de réparation de la membrane plasmique, un processus important pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, il a été montré que lors d'une blessure de la membrane plasmique, la protéine Alix et les protéines ESCRT-III sont recrutées au site de blessure. Le rôle des ESCRT, recrutées par

Alix, serait de former une vésicule (analogie au bourgeonnement viral), permettant l'expulsion de la partie de membrane blessée (Jimenez et al., 2014). Le calcium semble important pour ce phénomène puisque sa déplétion inhibe le recrutement de ces protéines. De façon similaire, un mutant d'Alix incapable de lier le calcium n'est plus recruté au site de la blessure. Etonnamment, un mutant d'Alix ne pouvant plus interagir avec le LBPA n'est également plus recruté, suggérant soit la présence de ce lipide à la membrane plasmique soit que ce site d'interaction d'Alix lui permet de lier d'autres lipides. Plus récemment, une étude a clairement démontré qu'Alg-2 est la première protéine à être recrutée, de façon calcium dépendante, au niveau de la blessure. Alg-2 permet de recruter Alix qui, à son tour, recrute les ESCRT et participent à la fermeture du trou (Scheffer et al., 2014).

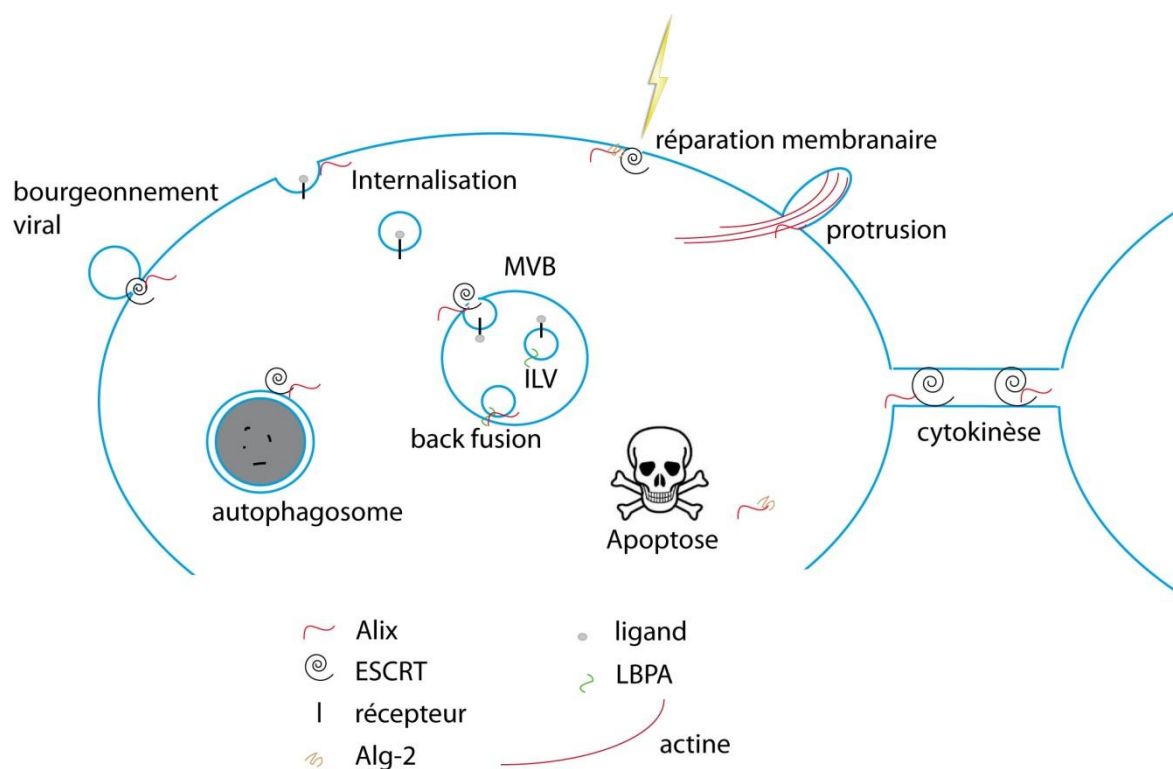


Figure 38 : Schéma récapitulatif des processus cellulaires impliquant Alix

De nombreux processus dans lesquels est impliquée la protéine Alix dépendent également des protéines ESCRT. De façon remarquable, la plupart des fonctions exercées par Alix impliquent des remodelages membranaires et la majorité ont lieu au niveau de la membrane plasmique.

3. But de l'étude

L'équipe neurodégénérescence et plasticité, dans laquelle j'ai effectué ma thèse, étudie la protéine Alix depuis sa découverte en 1999 (Missot et al., 1999). Comme nous l'avons vu, Alix est une protéine adaptatrice qui interagit avec de nombreux partenaires et a, de ce fait, été impliquée dans plusieurs processus cellulaires (Figure 38), dont l'endocytose.

En effet, Alix interagit avec ESCRT I et ESCRT III, des composants majeurs de la formation des ILVs au sein des MVBs ainsi que du tri des récepteurs ubiquitinés vers la voie de dégradation endolysosomale. Bro1, l'homologue d'Alix chez la levure, est indispensable à la dégradation des récepteurs ubiquitinés (Odorizzi et al., 2003). Chez les mammifères, Alix ne semble pas être un élément majeur de ce processus puisque la déplétion d'Alix n'est pas associée à des défauts majeurs de la dégradation de l'EGFR (Cabezas et al., 2005 ; Luyet et al., 2008). De plus, il a été proposé que HDPTP, (un homologue d'Alix contenant le domaine Bro1), est capable, dans les cellules de mammifères, de remplir la fonction de Bro1 puisque sa déplétion affecte de façon majeure la dégradation de l'EGFR et la formation des ILV (Doyotte et al., 2008). Récemment, une étude a impliqué Alix dans le tri de l'EGFR, même si les auteurs rapportent qu'elle n'est pas indispensable à ce phénomène (Sun et al., 2014). Ainsi, le rôle exacte d'Alix dans le tri des récepteurs ubiquitinés reste à ce jour encore confus. Alix est également impliquée dans la formation des ILV via son interaction avec le LBPA (Matsuo et al., 2004), puisque la déplétion d'Alix diminue à la fois le LBPA et le cholestérol détectables dans les cellules, ainsi que le nombre d'ILV par MVB (Chevallier et al., 2008). D'autres études ont impliqué Alix dans la formation des ILV dépendante de la syndécane et de la synténine (Baietti et al., 2012). De plus, Alix et le LBPA agissent conjointement afin de réguler le processus de back fusion au niveau du MVB (Bissig et al., 2013). L'ensemble de ces données suggèrent que la protéine Alix est un élément important pour réguler la biogénèse et/ou le devenir des ILV au niveau du MVB.

En plus de ce rôle au niveau du MVB, des études ont montré qu'Alix pourrait être impliquée dans la distribution des endosomes au sein de la cellule, probablement en faisant le lien entre les endosomes et le cytosquelette d'actine (Cabezas et al., 2005 ; Murrow et al., 2015).

Enfin, il a été montré qu'Alix régule l'endocytose de l'EGFR, avec ses partenaires CIN85 et les endophilines (Schmidt et al., 2004, Schmidt et al., 2005). Plus récemment, une autre étude a impliquée Alix et la Galectin-3 dans l'endocytose de l'EGFR (Liu et al., 2012).

De façon intéressante, la plupart des fonctions d'Alix, décrites à ce jour, concernent des déformation membranaires. Cependant, malgré les nombreux interacteurs d'Alix impliqués dans la voie endosomale (ESCRT, LBPA, CIN85, endophilines, galectin 3) et le rôle d'Alix proposé à différentes étapes de l'endocytose, la fonction précise d'Alix dans ce processus reste mal comprise à l'heure actuelle. Le principal objectif de mon travail de thèse a été de définir la fonction précise d'Alix dans la voie endocytaire.

Le laboratoire a développé, en collaboration avec la clinique de la souris à Strasbourg, une souris ko pour la protéine Alix. Ces souris sont viables et fertiles, bien que présentant un phénotype neuronal, qui est étudié par Marine Laporte, une doctorante du laboratoire. Nous avons isolé des MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) issues de ces souris ko Alix, afin d'étudier la fonction cellulaire de la protéine Alix et plus particulièrement de clarifier son rôle dans la voie endolysosomale.

L'objectif de mon travail de thèse a donc été de caractériser la voie endocytaire dans ces MEF ko pour la protéine Alix. Les questions que nous nous sommes posées au cours de ce travail de thèse étaient donc :

Qu'en est il du fonctionnement de la voie endolysosomale dans les MEF ko Alix ?

- Morphologiquement, quel est l'état des compartiments de la voie endolysosomale dans ces cellules?
- Est-ce que le fonctionnement de la voie endolysosomale est normal dans les MEF ko Alix? La dégradation de l'EGFR est elle affectée? Est-ce que le trafic est altéré dans ces cellules?
- Est-ce que l'étape d'internalisation à la membrane plasmique est perturbée en absence d'Alix?

Résultats

Contexte de l'étude

Alix est une protéine cytoplasmique adaptatrice de 95 kD composée de trois domaines : un domaine Bro N-terminal (Fisher et al., 2007; Kim et al., 2005), qui contient les sites de liaison à CHMP4B (ESCRT-III), (McCullough et al., 2008) ainsi qu'au LBPA (Bissig et al., 2013), un V-domaine central qui permet la dimérisation d'Alix (Pires et al., 2009) ainsi qu'un domaine PRD C-terminal qui contient des sites d'interaction avec de nombreux partenaires : Alg-2, Tsg101 (ESCRT I), CIN85 et les endophilines A (Chatellard-Causse et al., 2002). La protéine Alix a été impliquée dans plusieurs processus cellulaires tels que la formation des ILV (Matsuo et al., 2004 ; Chevallier et al., 2008), l'apoptose (Mahul-Mellier et al., 2006; Mahul-Mellier et al., 2008; Trioulier et al., 2004), la cytokinèse (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007), l'adhésion cellulaire (Cabezas et al., 2005; Pan et al., 2008) et la réparation de la membrane plasmique (Jimenez et al., 2014; Scheffer et al., 2014). De façon intéressante, la majorité des fonctions assurées par Alix ont lieu à la membrane plasmique. De plus, la plupart de ces activités dépendent de la capacité d'Alix à lier et à recruter les protéines ESCRT afin de permettre la déformation et la fission membranaire. Dans tous ces processus, la même topologie de déformation membranaire, dite « par l'intérieur » est assurée par les complexes ESCRT (Henne et al., 2013). A l'inverse, les partenaires d'Alix, CIN85 et les endophilines A, sont quand à eux impliqués dans l'invagination de la membrane plasmique lors de l'endocytose de récepteurs aux facteurs de croissance, une déformation membranaire dite « par l'extérieur » (Chen et al., 2000 ; Boucrot et al., 2014). Récemment, une étude a décrit une nouvelle voie CIE médiée par les endophilines (FEME)(Boucrot et al., 2014).

Dans cet article, nous avons utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris ko Alix pour analyser l'effet de l'absence d'Alix sur la voie endolysosomale.

Ainsi, nous avons montré que la dégradation de l'EGFR est ralentie, sans être bloquée, dans les MEF ko Alix. Une expérience de pulse chase de bsa-gold, en microscopie électronique, nous a aussi permis de mettre en évidence que le trafic endolysosomal n'est pas affecté dans ces cellules mais décalé du fait d'un défaut d'internalisation. De plus, la morphologie des endosomes, et en particulier des MVB, n'est pas altérée de façon majeure par l'absence d'Alix. Nous avons également observé que l'internalisation de la phase fluide (dextran) et de différents cargos, est affectée par la déplétion d'Alix. En effet, l'internalisation du wga, de l'EGF à forte concentration, du GPI-GFP, de l'intégrine $\beta 1$ ou encore de la CTxB est inhibée dans les MEF ko Alix. De façon intéressante, tous ces cargos sont internalisés, au moins en partie, par CIE. Ainsi, nous montrons que l'inhibition de l'endocytose associée à la déplétion

d'Alix est spécifique de la CIE puisque l'endocytose de la transferrine ou de l'EGF à faible concentration ne sont pas affectées dans les MEF ko Alix. De plus, nous avons confirmé que la composante CME de la CTxB n'est pas inhibée par l'absence d'Alix. L'expression d'Alix dans les MEF ko Alix restaure l'internalisation de la CTxB, révélant la spécificité du rôle d'Alix dans la CIE de la CTxB. Par contre, l'expression d'un mutant d'Alix délété de son site d'interaction avec les endophilines (Alix Δ endophiline) ne restaure pas l'internalisation de la CTxB, suggérant qu'Alix et les endophilines agissent de concert dans la CIE de la CTxB. Nous avons également pu observer que la CTxB induit le recrutement, au niveau de DRM, d'Alix et de l'endophiline A2, indépendamment l'une de l'autre, à la membrane plasmique. Enfin, nous avons montré que le défaut d'endocytose de l'intégrine β 1, dans les cellules ko Alix, est associé à une perturbation de la mobilité de ces cellules. L'expression d'Alix dans les MEF ko Alix restaure cette mobilité alors que l'expression d'Alix Δ endophiline n'a pas d'effet. Ce résultat montre que la conséquence du blocage de cette voie médiée par Alix et les endophilines est une inhibition de la mobilité cellulaire qui est connue pour être dépendante de la CIE (Howes et al., 2010). De plus, la signalisation induite par l'IL2R, un cargo CIE, est fortement affectée par la déplétion d'Alix, ces données suggèrent donc un rôle physiologique important de la CIE dépendante d'Alix et des endophilines.

En conclusion, cette étude montre pour la première fois qu'Alix contrôle spécifiquement la CIE, au niveau de l'étape d'internalisation et en partenariat avec les endophilines. De plus, l'inhibition de cette CIE dépendante d'Alix et des endophilines affecte la physiologie cellulaire. Cette découverte fait des souris ko Alix un modèle parfait pour étudier le rôle de la CIE *in vivo*.

1. La protéine Alix est impliquée dans l'endocytose indépendante de la clathrine

Article : **ALG-2 interacting protein-X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis.**

Vincent Mercier^{1,2}, Marine Laporte^{1,2}, Olivier Destaing^{3,4,5}, Béatrice Blot^{1,2}, Karin Pernet-Gallay^{1,2}, Yasmina Saoudi^{1,2}, Corinne Albiges-Rizo^{3,4,5}, Sandrine Fraboulet^{1,2}, Anne Petiot^{1,2} and Rémy Sadoul^{1,2,*}

A soumettre

ALG-2 interacting protein-X (Alix) is essential for clathrin-independent endocytosis.

Vincent Mercier^{1,2}, Marine Laporte^{1,2}, Olivier Destaing^{3,4,5}, Béatrice Blot^{1,2}, Cédric Blouin^{6,7,8}, Karin Pernet-Gallay^{1,2}, Yasmina Saoudi^{1,2}, Corinne Albiges-Rizo^{3,4,5}, Sandrine Fraboulet^{1,2}, Anne Petiot^{1,2} and Rémy Sadoul^{1,2,*}

1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 836, F-38042 Grenoble, France

2) Université Grenoble Alpes, Institut des Neurosciences, F-38042 Grenoble, France

3) INSERM IAB, Unité 823, F-38000 Grenoble, France

4) Université Grenoble Alpes, IAB, F-38000 Grenoble, France

5) CHU de Grenoble, IAB, F-38000 Grenoble, France

6) Institut Curie- Centre de recherche Endocytic Trafficking and Therapeutic Delivery group F-75248 Paris, France

7) CNRS UMR3666 F-75005, Paris, France

8) INSERM U1143, F-7505 Paris, France

* : corresponding author

Acknowledgements: This work was funded by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR), MALZ program, France. V.M and M. L. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France. We thank for their help, F. Vossier for cell cultures, J. Delaroche for electron microscopy, all members of the laboratory, K. Sadoul for critically reading the manuscript and F. Hemming for English editing. The authors declare no competing financial interests.

Abstract: The molecular mechanisms and the biological consequences of clathrin-independent endocytosis (CIE) remain largely unknown. Recently, isoforms of endophilin A, have been demonstrated to allow clathrin-independent entry of several activated receptors and toxins. We have previously shown that a major interactor of endophilin A is Alix (ALG-2 interacting protein X), also known as a possible regulator of the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) both in endosomes and at the plasma membrane. Using Alix ko mouse embryonic fibroblasts, we demonstrate here that Alix deletion does not significantly affect endosomal trafficking per se but impairs CIE of several cargoes including the receptors for EGF (EGFR) and IL-2 (IL-2R), β 1 integrin, GPI-anchored proteins and the B chain of cholera toxin (CTxB), while leaving intact CME of the transferrin receptor (TfR),

CTxB and the EGFR. Furthermore, Alix capacity to restore CIE of CTxB tightly depends on its capacity to bind endophilin A and both proteins act in the same pathway. The lack of Alix expression also impaired cell migration and inhibited STAT5 signalization occurring after IL-2 stimulation. Taken together, our results define for the first time Alix as a central actor of CIE and give first hints of the biological consequences of this internalization process.

Introduction

The plasma membrane of all eukaryotic cells is constantly being renewed through cycles of endocytosis and exocytosis. Cell surface proteins and lipids are internalized by vesicular compartments, which merge in early endosomes. Endocytosis is central for the regulation of nutrient uptake, cell surface receptor signaling, plasma membrane remodeling, cellular mobility and synaptic vesicle recycling. Most of these processes rely on clathrin which allows membrane deformation into endocytic vesicles. However it is today clear that clathrin-independent endocytosis (CIE) also occurs at the plasma membrane, even though the molecular mechanisms allowing membrane bending and fission, as well as the biological consequences of this type of endocytosis remain largely unclear (Mayor et al., 2014).

A recent breakthrough into defining molecular actors of CIE came from two reports demonstrating that in several cell lines, endophilin-A controls CIE of activated receptors including those for EGF and IL-2, and that this pathway is hijacked by shiga- or cholera bacterial toxins (Boucrot et al., 2014; Renard et al., 2014). Endophilins-A1, A2 and A3 are BAR (Bin/amphiphysin/Rvs)-domain-containing proteins (Ringstad et al., 1997), already known for their involvement in both CME (Gad et al., 2000; Guichet et al., 2002; Milosevic et al., 2011; Schuske et al., 2003; Verstreken et al., 2002) and CIE at synapses (Kononenko et al., 2014; Llobet et al., 2011), through recruitment of dynamin and synaptojanin. We have previously shown that, besides these two proteins, one main interactor of endophilin A is Alix (ALG-2-interacting protein X), first identified through its calcium-dependent binding to the penta-EF-hand protein ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) (Chatellard-Causse et al., 2002; Missotten et al., 1999). Alix is a 95 kD cytoplasmic protein containing an N-terminal Bro1-like domain (Fisher et al., 2007; Kim et al., 2005), which binds to the endosome residing lipid LBPA (lysobisphosphatidic acid) (Bissig et al., 2013; Matsuo et al., 2004) and to CHMP4B of ESCRT-III (endosomal sorting complexes required for transport) (McCullough et al., 2008). Following the Bro1 domain is a V-shaped middle domain composed of two three-helical bundles allowing dimerization of the protein (Pires et al., 2009). The C-terminal part is made of a long proline-rich domain (PRD) with distinct sites of interactions with multiple partners

including Tsg-101 of ESCRT-I, ALG-2 and Cbl Interacting protein-85 (CIN85) as well as endophilin-A (Chatellard-Causse et al., 2002). Alix is ubiquitously expressed and has been involved in numerous biological processes including programmed neuronal death (Mahul-Mellier et al., 2006; Mahul-Mellier et al., 2008; Trioulier et al., 2004), virus egress (Fisher et al., 2007; Strack et al., 2003), cytokinesis (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007), cell spreading (Cabezas et al., 2005; Pan et al., 2008) and membrane repair (Jimenez et al., 2014; Scheffer et al., 2014). Until today, most of these activities have been linked with Alix capacity to bind and recruit proteins of the ESCRT complexes involved in membrane bending and fission. These complexes act in outward vesiculation, thus forming vesicles in endosomes and at the cell surface (Henne et al., 2013; Ren and Hurley, 2011; Rusten et al., 2012; Sadoul, 2006), whereas other Alix interactors, CD2AP/ CIN85 and endophilin-A, act in the opposite way to promote membrane invaginations during ligand-dependent receptor endocytosis (Chen et al., 2000; Lynch et al., 2003; Petrelli et al., 2002; Soubeyran et al., 2002).

Here, we have used Alix ko mouse embryonic fibroblasts (MEFs) to study the effect of the lack of Alix on the endosomal pathway. We find that fluid phase endocytosis and internalization of several cargoes is impaired in Alix ko cells, even though endosomal morphology and trafficking are apparently normal. Interestingly, this impairment in endocytosis only affects CIE but not CME. We also demonstrate that the role of Alix in CIE is tightly dependent on the capacity of the protein to bind to endophilin-A, and that both proteins act in a common pathway. Finally, we provide the first demonstration that cargo endocytosis through the Alix/ endophilin-A pathway is required for cell mobility and IL-2R signaling.

Keywords: endophilin-A, clathrin-independent endocytosis, Alix knock-out, PDICD6IP, IL2, MEF.

Results:

Absence of Alix delays EGFR degradation.

To clarify the role of Alix in endocytosis, we used MEFs derived from Alix ko mice recently obtained in the laboratory, which will be described elsewhere. We first tested the effect of the absence of Alix expression on the degradation of the EGFR, which requires ESCRTs for sorting inside multivesicular bodies (MVBs). In wild type (wt) MEFs deprived of serum, addition of 100 ng/ml EGF led to a rapid loss of EGFR within 6 h after EGF addition. This loss was due to lysosomal degradation as it was inhibited by bafilomycin known to block lysosome acidification (Fig.1A). EGFR degradation was slightly but significantly delayed in Alix ko cells, as early as 30 min, and for at least 6 h after the beginning of incubation with EGF (Fig. 1A and B).

One possible explanation for the delay of EGFR degradation observed in Alix ko cells could be perturbations of endosomes which were reported upon Alix down-regulation (Cabezas et al., 2005; Matsuo et al., 2004). However, neither the distribution nor the morphology of EEA1-, Rab 11-, LBPA- or Lamp1 -positive compartments corresponding to early endosomes, recycling endosomes, MVBs and late endosomes/ lysosomes respectively, seemed affected in Alix ko cells (Fig. S1).

Alix deletion impairs endocytosis while leaving intact trafficking through endosomes.

Using electron microscopy, we followed the uptake and endosome trafficking of BSA-gold particles in MEFs to detect possible impairments due to the lack of Alix expression (Fig. S2 A). MEFs were incubated with 6 nm BSA-gold particles for 10 min and chased for 20 or 50 min. At all time points, the number of BSA-gold particles was estimated in endocytic structures, which we grouped into five categories (type 1 to 5), according to the classification of Möbius et al. (Möbius et al., 2003) (Fig. 2A). Type 1 structures represent plasma membrane invaginations and type 5 structures correspond to lysosomes. In wt cells, after 10 min incubation, the majority of particles were already found in closed vesicles and early endosomes (type 2 and 3) (Fig. 2A). After 20 min chase, the particles were mainly detected in MVBs (type 4) and after 50 min in late endosomes/ lysosomes (type 5), reflecting the normal endosomal traffic of the BSA-gold particles. In Alix ko cells, a significant delay in endocytosis and trafficking to early endosomes was seen as early as at 10 min with nearly 50 % fewer particles found in early endosomes (type 3). The delay in trafficking was kept constant over the 20 and 50 min chase period, revealed by fewer particles in type 4 and 5 compartments, respectively (Fig. 2A). Importantly, we did not detect any gross morphological

abnormalities of endosomes and lysosomes in Alix ko cells. The relative numbers of type 3, 4 and 5 endosomes were equivalent between wt and Alix ko cells and the mean diameter of MVBs and lysosomes was unchanged. The only noticeable difference between both cell types was a small but significant decrease in the number of intraluminal vesicles per MVB in Alix ko cells (Fig. S2E). Thus, the absence of Alix seems to perturb early steps of endocytosis without interfering with the following steps along the late endosomal pathway.

We confirmed an impairment in fluid phase endocytosis by showing that uptake of tetramethylrhodamine dextran during a 10 min chase was reduced by 33% in Alix ko compared to wt cells (Fig. 2B). Finally, endocytosis of fluorescent wheat germ agglutinin (WGA), a lectin binding to gangliosides and most cell surface glycoproteins, was also reduced by 50% in Alix ko cells (Fig. 2C). Thus Alix deletion seems to affect constitutive cargo endocytosis.

Clathrin-independent endocytosis is selectively disrupted in Alix ko cells.

In view of the lack of either gross endosomal abnormalities or obvious impairment in endosome trafficking, we reasoned that the delay in EGFR degradation observed in Alix ko cells might result from a delay in its endocytosis. We found that this is indeed the case since internalization of EGFR revealed by fluorescent EGF, was significantly decreased in Alix ko MEFs challenged with 100 ng/ml EGF (Fig. 3). In contrast, no delay in endocytosis could be detected with 2 ng/ml EGF. This was a first hint that Alix might be selectively involved in CIE since low EGF concentrations trigger CME of EGFR, whereas high concentrations lead to CIE of a fraction of the endocytosed receptor (Sigismund et al., 2013; Sigismund et al., 2008). Furthermore, uptake of fluorescent transferrin (Tf) did not differ between Alix ko and wt cells (Fig. 3), showing that Alix does not influence internalization of the Tf receptor, which is entirely clathrin-dependent. Integrin internalization by adherent cells which is important for cell adhesion and spreading, occurs through both CME and CIE (Margadant et al., 2011) (Lakshminarayan et al., 2014). Endocytosis of $\alpha 1$ integrin was followed using an antibody against the activated form of the integrin and found to be impaired in Alix ko cells (Fig. 3). Consistent with this delay, we observed a 25 % increase in cell spreading of Alix ko MEFs 2 h after seeding on fibronectin (Fig. S3).

We went on to test the internalization of glycosylphosphatidylinositol (GPI) coupled to GFP (GPI-GFP), as GPI-anchored proteins are endocytosed by CIE pathways (Kirkham and Parton, 2005). The antibody-induced internalization GPI-GFP by Alix ko cells was reduced by more than 60 % compared to wt cells, further showing that Alix deletion severely impairs

CIE (Fig. 3). Another well characterized CIE cargo is the β chain of the IL2R. here again endocytosis of the protein expressed in Alix ko MEFs was severely reduced compared to that in wt cells (Fig.3).

Alix deletion affects CTxB internalization.

CIE is known to be hijacked by toxins like cholera. The pentameric B chain of cholera toxin (CTxB) binding to GM1 of the plasma membrane leads to the nucleation of lipid rafts and endocytosis of the toxin (Ewers and Helenius, 2011; Rodighiero et al., 2001). CTxB uptake through CIE was confirmed in wt MEFs, since it was halved upon pretreatment with filipin, which sequesters membrane cholesterol, thereby blocking CIE without affecting CME. Consistent with the fact that CTxB entry also occurs to a lesser extent through CME (Mayor et al., 2014), chlorpromazine treatment, which blocks CME, also reduced CTxB uptake by 25 % (Fig. 4). CTxB binding to the plasma membrane at 4°C was comparable between Alix ko and wt cells (Fig. S4A). However, the amount of CTxB endocytosed at 37°C by Alix ko cells was reduced by half compared to wt cells, down to a level similar to that observed in filipin treated wt cells (Fig. 4). CTxB uptake by Alix ko cells was reduced upon chlorpromazine treatment, as seen in wt cells, but remained unaffected upon filipin treatment (Fig. 4). These results together with the lack of TfR-endocytosis defects in Alix ko cells, further demonstrate that Alix is a main actor of CIE but is not implicated in CME.

After internalization, CTxB is known to traffic down to the Golgi apparatus (Ewers and Helenius, 2011). In both wt and Alix ko cells, endocytosed CTxB was detected after 30 min in the Golgi apparatus labelled by GM130 antibodies, thus revealing that, in the long term, the absence of Alix does not grossly modify intracellular trafficking of the toxin (Fig. S4B).

Alix and endophilin-A relocate to membrane patches containing CTxB.

In Alix ko MEFs transfected with GFP-Alix, Alix was homogeneously localized in the cytoplasm and sometimes at discrete regions of the plasma membrane like at the leading edge (Fig. 5A). In contrast, after incubation for 20 min at 4°C with CTxB, Alix was redistributed to small plasma membrane patches (~400 nm) decorated by the toxin (Fig. 5A). About 40% of the patches concentrating CTxB were also positive for GFP-Alix (Fig.5D). After 1 min at 37°C, fluorescent CTxB was sometimes seen in tubules at the cell edges which were decorated by Alix (Fig. 5A lower panel). Tf added to MEFs at 4°C also concentrated in patches, which were smaller than CTxB positive patches but not labelled with GFP-Alix (Fig. 5B).

CTxB is known to bind to GM1 gangliosides of the plasma membrane, and to associate after binding with detergent resistant membranes (DRMs) (Wolf et al., 2002). Incubation with Triton-X100 of MEFs expressing GFP-Alix labelled with CTxB removed all cytoplasmic GFP-Alix labelling, leaving behind GFP-Alix aggregates sometimes labelled by CTxB (Fig. S4C). Triton-X100 solubilization of GFP-Alix-expressing MEFs labelled with Tf washed out all the Tf positivity and most of the GFP-Alix (Fig. S4C). Thus, our results show that cytoplasmic Alix is recruited to detergent resistant lipid microdomains formed upon CTxB binding, likely corresponding to entry sites of the toxin.

We next tested if Alix relocalization to CTxB membrane patches requires binding to endophilin-A, which is also recruited to these sites (Boucrot et al., 2014; Renard et al., 2014). As expected and akin to Alix, endophilin-A2 was indeed recruited, but only to 25% of the CTxB containing patches of wt MEFs (Fig. 5C upper panel, Fig. 5D). The amount of Endophilin-A2 recruited to CTxB-membrane patches was similar between Alix ko and wt cells indicating that Alix is not required for endophilin-A2 recruitment (Fig. 5C, D). In Alix ko cells co-expressing GFP-Alix and Myc-endophilin-A2, both proteins were found to colocalize with CTxB patches (Fig. 5C lower panel). Alix interacts with the SH3 domain of endophilin-A through a poly-proline rich stretch (P⁷⁴⁸-P⁷⁶¹) (Chatellard-Causse et al., 2002). A mutant deleted of these amino-acids (Alix Δ endo) expressed in Alix ko cells, also relocalized to CTxB patches, although to a lesser extent, than with wt Alix (Fig. 5D). Thus, endophilin-A and Alix can be recruited independently to plasma membrane patches formed upon CTxB binding, even if Alix seems stabilized or its recruitment facilitated at these sites, by binding endophilins.

Alix acts in the same pathway as endophilin-A to control CIE

Rescue experiments using viral transduction (Fig. S5A) showed that impairment in CTxB CIE observed in Alix ko cells is solely due to the absence of Alix, since Alix expression fully restored the capacity of Alix ko cells to internalize CTxB (Fig. 6A,B). In sharp contrast, Alix Δ endophilin expression was not able to rescue CTxB endocytosis by Alix ko MEFs, demonstrating that Alix needs to interact with endophilin-A in order to drive CIE of CTxB (Fig. 6A,B).

To test the effect of endophilin depletion on CTxB endocytosis, endophilin-A2, the endophilin-A isoform expressed in fibroblasts (Fig. S5B), was downregulated using Sh constructs (ShGFP-endo) (Fig. S5C). In accordance with the reports of Renard et al. (2014) and Boucrot et al. (2014), endophilin-A2 depletion diminished CTxB endocytosis by 50% in

MEFs (Fig. 6 C,D). CTxB uptake was further reduced by chlorpromazine but not by filipin, suggesting that endophilin-A2 depletion blocked CIE but not CME of CTxB (Fig. S6). In sharp contrast to wt cells, knocking-down endophilin-A2 in Alix ko cells did not reduce CTxB uptake any further (Fig. 6C,D), demonstrating that Alix and endophilin act in a common pathway to control CIE.

CIE has been shown to be required for cell migration (Howes et al., 2010) as recently confirmed in the case of endophilin-A knock down (Boucrot et al., 2014). Accordingly, a wound healing assay revealed that the speed of migrating Alix ko cells in the wound was significantly reduced compared to wt cells (Fig.7A). Using viral transduction, we found that Alix expression increased the velocity of Alix ko MEFs to the level of wt cells, and that this rescuing effect was absent in cells expressing Alix Δ endophilin (Fig. 7B). Thus migration defects caused by Alix depletion correlate with Alix capacity to control endophilin dependent CIE.

Based on our finding that Alix is required for endocytosis of the IL2R β -chain we tested whether Alix depletion alters IL-2R signaling. IL-2 binding to its receptor activates a variety of pathways including JAK tyrosine kinases and subsequent phosphorylation of the transcription factor STAT5. We found that knocking down Alix expression in a human T cell line severely impaired STAT5 phosphorylation following IL-2R activation (Fig. 7C) demonstrating for the first time that CIE of the activated receptor is mandatory for STAT5 signaling.

Discussion

In this study, we used Alix ko cells to study how the lack of Alix expression impairs endosomal pathways in fibroblasts. Following the observation of a delay in EGFR degradation in Alix ko cells, we showed that EGFR endocytosis is compromised but only when high concentrations of EGF are used for stimulation, a condition known to favor CIE of the receptor. Fluid phase endocytosis and endocytosis of other cargoes known to enter cells through CIE, among which CTxB, were also impaired in Alix ko cells. Alix function in CTxB endocytosis was linked to endophilin-A, which was recently reported to be necessary for the entry of bacterial toxins (Renard et al., 2014) and internalization of surface receptors including those for EGF and IL-2 (Boucrot et al., 2014). Finally, we showed that Alix ko cells are defective in cell migration, in accordance with a role of CIE in this process. We also found that signalization through IL2R was strongly impaired by Alix down-regulation, giving the first demonstration that internalization of this well known CIE cargo is mandatory for its signaling function.

Based on its homology with the yeast protein Bro-1, which binds ESCRT-III and is required for cargo sorting in MVBs, Alix has often been put forward as a major player in this process in mammalian cells. However, we did not detect any gross abnormalities in the endosome morphology or endosomal trafficking in Alix ko cells. This agrees with the report from Doyotte et al. (2008) showing that knocking-down Alix did not lead to impairments in endosomal cargo sorting and MVB morphogenesis (Doyotte et al., 2008). In the same publication the authors observed severe MVB abnormalities in cells depleted of the Bro1/Alix related protein His domain phosphotyrosine phosphatase (HD-PTP), thus reattributing to the latter the function in intraluminal vesicle (ILV) formation first put on Alix. Instead of regulating the budding of ILVs, Alix together with ESCRT proteins and the lipid LBPA seems to allow their fusion to the endosomal limiting membrane, a process triggered by some viruses and the Anthrax toxin to allow their entry into the cytosol (Le Blanc et al., 2005)(Abrami et al., 2013). Interestingly, the only abnormal feature that we detected in endosomes of Alix ko cells was a slight decrease in the number of ILVs in MVBs, compatible with a possible regulatory role of the protein in ILV backfusion. However, our finding could also be explained by a defect in growth factor receptor endocytosis, which in the case of EGFR, is known to regulate the number of ILVs inside MVBs (Futter et al., 1996).

Decrease in EGF uptake by Alix ko cells was only detectable when using high concentrations of the ligand a condition known to trigger CIE entry of EGFR (Sigismund et al., 2013; Sigismund et al., 2008). Interestingly, Alix directly interacts at the plasma membrane with

both endophilins and CIN85, forming complexes regulating EGFR endocytosis (Soubeyran et al., 2002). Recently Boucrot et al. reported a requirement for both endophilins and CIN85 in CIE (Boucrot et al. 2014) compatible with the hypothesis that Alix orchestrates a “ménage à trois” with CIN85 and endophilins to allow CIE.

CTxB CIE was tightly dependent on Alix capacity to bind the SH3 domain of endophilin-A, acting in this same process (Renard et al., 2014). Most remarkably, we demonstrated that both proteins act in the same pathway. Both Alix and endophilins were recruited independently to non-clathrin coated sites of CTxB uptake, even though Alix interaction with endophilin-A seemed to favor or stabilize its recruitment. Endophilin-A binding to clathrin-independent endocytic sites can occur both through their SH3 domain (Boucrot et al., 2014) or their BAR domains recognizing concave cytoplasmic surfaces of the plasma membrane (Renard et al., 2014), thus leaving SH3 domains free to interact with Alix. One possible mechanism for Alix recruitment to the plasma membrane independently of endophilin-A is the binding to ALG-2, which tightly depends on calcium and was recently shown to mediate Alix recruitment following membrane damage (Scheffer et al., 2014). Another possibility is Alix binding to LBPA, or to a related phospholipid, since there is today no evidence of the presence of this lipid at the plasma membrane. Following binding to LBPA of endosomal membranes, Alix changes its conformation leading to the insertion of a hydrophobic loop in the cytoplasmic leaflet of the bilayer (Bissig et al., 2013). Alix insertion at the plasma membrane could contribute to spontaneous curvature of the membrane or to the making of assemblies of CIN85 and endophilins required for membrane deformation and scission.

Noteworthy, Boucrot et al. (2014) have restricted endophilin internalization routes to the internalization of given ligand-activated receptors, including EGFR and IL-2R, but not that of GPI-anchored receptors or fluid phase endocytosis, which we showed also depend on Alix. Further work is required to define whether endophilin binding to Alix is also mandatory for these endocytic processes. The variety of cargoes entering Alix-driven CIE suggests a role of this pathway in many cellular functions. We have already correlated the Alix-endophilin pathway to cell migration in good agreement with the demonstrated role of CIE in this process (Howes et al., 2010). Internalization of cell surface activated receptors is a major way to regulate cell signaling, which can occur both at the cell surface or inside endosomes. However, it is today unclear how CIE or CME of receptors affect signalization. At high EGF concentrations, Boucrot et al (Boucrot et al., 2014) claimed a slight and transient overactivation of the EGFR ERK signaling in endophilin knockdown cells, suggesting that CIE of the receptor is required for downregulation of the signaling. In our case knocking

down Alix had the opposite effect on IL-2R signaling since it strongly reduced STAT5 phosphorylation. The only endocytic route of IL-2R is through CIE (Lamaze et al., 2001) and the absence of Alix severely impaired endocytosis of the β -chain of the receptor. Thus our results show for the first time the necessity of CIE for IL-2R signaling, supporting the hypothesis that interleukin receptors need to be clustered in endosome for signaling (Gandhi et al., 2014).

The double role of endophilins in both CIE and CME is no doubt partly responsible for previous conflicting results, thwarting our present understanding of these pathways in normal physiology, in particular in regulating cell signaling and synaptic vesicle formation, where they both occur (Kononenko et al., 2014; Watanabe et al., 2013; Watanabe et al., 2014). The lethal phenotype observed in endophilin ko mice make endophilin deletion inadequate to resolve this issue. Our finding that Alix mediates only CIE, leaving CME unimpaired, highlights Alix ko mice, which are viable, as a valuable model to understand the exact physiological role of CIE *in vivo*.

Materials and methods

Antibodies and other reagents

Antibodies used were: monoclonal and polyclonal anti-FLAG antibodies from Sigma-Aldrich, polyclonal anti-Alix from Covalab, monoclonal anti-actin and polyclonal anti clathrin from Millipore, polyclonal antibodies against EGFR, Myc and EEA1 were from Santa Cruz, anti-GFP and anti-LAMP1 from Abcam, monoclonal anti-Rab11 and anti-GM130 from BD transduction, monoclonal anti- β 1 (9EG7) was from BD pharmingen, anti-STAT5 and anti-phosphorylated STAT5 were from. Monoclonal anti-LBPA (6C4) antibody and polyclonal anti-endophilin A were generous gifts from Jean Gruenberg (Geneva, Switzerland) and Pietro De Camilli (New Haven, United States) respectively. Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 and Alexa 594-WGA, as well as EGF-TRITC (Epidermal Growth Factor-TRITC), CTxB-TRITC (Cholera Toxin-TRITC), Tf-TRITC (transferrin-TRITC) and Dextran-TRITC were from Molecular Probes. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were from Jackson Laboratories. Filipin, chlorpromazin, EGF, bafilomycin A1 were from Sigma-Aldrich. 6 nm BSA-Gold tracer was from Aurion (The Netherlands).

DNA constructs

Flag-Alix, Flag-Alix Δ endophilin (Alix Δ PP14) and Myc-endophilin A2 constructs were described previously (Chatellard-Causse et al., 2002). GFP-Flag-Alix was obtained by subcloning Flag-Alix cDNA into a pEGFP-C vector (Clontech). GFP-GPI construction was a generous gift from Christophe Lamaze (Paris, France). The shRNA expression vectors were constructed as follows: two complementary oligonucleotides were synthesised, annealed and ligated into the expression vector pSuper-GFP using BglII and HindIII restriction sites. The correct sequences of pSuper GFP containing either sh endophilin A2 or the scrambled sequence were confirmed by nucleotide sequencing. For shRNA against mouse endophilin A2, the top strand sequence was 5' GATCCCCGCCTTGACTTTGACTACAAGAT TCAAGAGATCTTGTAGTCAAAGTCAAGGCTTTTTA 3', and the bottom strand sequence was 5' AGCTTAAAAAGCCTTGACTTTGACTACAAGATCTCTTGAATCTTGTAGTCAAA GTCAAGGCGGG 3'. As a negative control, a scrambled shRNA was cloned in the same vector;

the top strand sequence was 5' ATCCCCATATACGTCACCTAGCGGCATTTCAAGAGAATG CCGCTAAGTGACGTATATTTTTA 3', and the bottom strand sequence was 5' AGCTTAAAAATATACGTCACCTAGCGGCATTCTCTTGAAATGCCGCTAAGTGACGT ATA TGGG 3'. The Alix small hairpin RNA was cloned downstream of the human H1 promoter in the vector pSuperGFP (Oligoengine). The sequences of the synthetic oligonucleotides (Invitrogen) used for Alix small hairpin RNA construct were the following:

5' GATCCCCGCCGCTGGTGAAGTTCATCTTCAAGAGAGATGAACTTCACCAGC GGCTTTTGGAAA 3' and 5' AGCTTTTCCAAAAAGTTCATCCA GCAGACTTACTCTCT TGAAGTAAGTCTGCTGGATGAACGGG-3'

Generation of Alix ko fibroblasts

Alix ko mice were obtained in collaboration with the Clinique de la souris (Strasbourg, France). Briefly, exon 2 of *alix* (chromosome 9) was targeted by LoxP site. Complete ko were obtained by backcrossing the floxed mice with CMV-Cre mouse. The recombination changes the reading frame introducing a stop codon. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were obtained as follows: E12.5 embryos were decapitated, thoroughly minced, and trypsinized in 1 ml 0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA (LifeTechnologies, Inc.) for 20 min at 37°C. DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine (Invitrogen), 100 units/ml penicillin was added to the suspension. After mechanical dissociation, cells were plated in a 10-cm culture dish and cultured at 37°C, in 5% CO₂. MEFs from 3 individual embryos (wt or Alix ko) were pooled and frozen in liquid

nitrogen.

Rescue experiments

For rescue experiments, cDNAs were delivered via retroviral transduction following packaging in Phoenix-Eco cells, as recommended by their provider (ATCC, Manassas, VA). Supernatant containing viral particles from these cells was harvested, 0.45µm filtered, supplemented with 8µg/ml polybrene (Sigma, St Louis, MO) and then used to transduce fibroblasts.

Cell culture, transfections and treatments

MEFs and N2a were cultured in DMEM, supplemented with 10% FBS and 2 mM glutamine. $4 \cdot 10^4$ cells were transfected 24 h after plating with Jet PEI PolyPlus (InvitroGene, France) and analysed after 24 h for DNA transfection or 72 h for shRNA.

EBV-B cells, immortalized from control patients described in (Vogt et al., 2005), were maintained in culture in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% bovine fetal serum.

EBV-B cells were transfected with the indicated plasmids using the Neon™ transfection system (Invitrogen). 72 h after transfection, cells were treated or not with 1000 U/ml of human IL-2 (kind gift of Dr Vogt) at 37°C for 10 minutes. For biochemical analysis, cells were washed with ice cold PBS and lysed in SDS Sample Buffer 1X. Total lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western blot analysis. To detect pSTAT5 activation in EBV-B cells, immunoblot signal was enhanced by Supersignal West Dura (Pierce).

Immunofluorescence

MEFs were seeded at $4 \cdot 10^4$ cells per 35 mm dish and grown on coverslips at 37°C. Cells were washed twice with PBS and fixed by 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min. After permeabilisation with 0.25% Tween in PBS containing 3% BSA for 30 min, antibodies were applied for 1 h at room temperature, then revealed with goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G coupled to Alexa 594 or Alexa 488, diluted in PBS/ 0,25%Tween. Nuclei were stained using Hoechst 33258 (Sigma). Coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem).

Internalization assays

For internalization experiments, MEFs were seeded at 4.10^4 cells per 35 mm dish and were grown on coverslips at 37°C.

CTxB internalization: MEFs were washed with cold DMEM containing 0.2% BSA and 20 mM HEPES and incubated with 2 μ g/ml CTxB-TRITC for 20 min at 4°C. Unbound proteins were removed by washing with cold PBS containing 0.2% BSA and 20 mM HEPES and cells were then incubated for different times at 37°C in DMEM containing 0.2% BSA to allow internalization or at 4°C for controls. After washing with cold PBS containing 0.2% BSA, cells were sometimes stripped 2 min with 25 mM sodium acetate in DMEM pH 2, and then neutralized by 25 mM Tris in DMEM, pH 10, before washing with cold PBS containing BSA and fixing with 4% PFA. For filipin (1 mg/ml) and chlorpromazine (10 μ g/ml), cells were treated for 30 min in DMEM containing 0.2% BSA and 20 mM HEPES at 4°C, as well as during the CTxB uptake period at 37°C. Samples were imaged by a Zeiss axiovert 200 microscope using a 20x or 40x objective for uptake quantification. Samples were also imaged by confocal microscopy with 63x or 40x oil immersion objectives. For uptake quantification, images were background subtracted, cellular regions were marked, and the mean fluorescence intensity was measured in these regions using ImageJ. Intensities were normalized to binding of CTxB at 4°C. Results are expressed as a ratio of wt uptake, considered as 1.

EGF-TRITC, transferrin-TRITC, GPI-GFP, IL2R β and β 1 integrin internalization: MEFs were rinsed with cold DMEM containing 0.2% BSA and 20 mM HEPES and incubated either 45 min on ice with EGF-TRITC (100 ng/ml or 2 ng/ml), 4 μ g/ml monoclonal anti-GFP, 4 μ g/ml monoclonal anti- β 1 integrin antibody, or 20 min on ice with 40 μ g/ml transferrin-TRITC. For EGF-TRITC and transferrin-TRITC, MEFs were starved for 4 h before incubation at 4°C with ligands. For GPI-GFP, IL2R β and β 1 integrin, internalized antibody was detected using a fluorescently labelled secondary antibody. Internalization, stripping, fixation and quantification were performed as described for CTxB. For EGF-TRITC, transferrin-TRITC and β 1 integrin, binding levels were checked and were the same in WT and Alix ko cells. For GPI-GFP and IL2R β transfected MEFs, intensities were normalized using binding of anti GFP at 4°C.

Dextran-TRITC internalization: cells were incubated for 10 min at 37°C with 3 mg/ml Dextran in internalization medium (5 mM glucose), washed 5 times with PBS containing BSA and fixed with 4% PFA. Internalized dextran was quantified using ImageJ.

WGA internalization: cells were washed with cold PBS containing 0.2% BSA and incubated 5 min at 4°C with 2 μ g/ml WGA-A594. Internalization was quantified as for CTxB.

Fluorescent microscopy

Images were acquired by Metamorph with a Zeiss Axiovert microscope using 20x or 40x objectives (for uptake quantification) or 63x Plan-Apochromatic oil immersion objective (NA 1.3, Zeiss) or by Zen software with a Zeiss LSM 710 inverted confocal microscope or a Zeiss LSM 880 inverted confocal Airyscan microscope with 40x oil objective (NA 1.3, Zeiss) or 63x oil objective (NA 1.4, Zeiss). Laser lines at 488 nm, 561 nm and 633 nm were used for exciting fluorophores. Pinhole size was usually set to generate 1 μ m-thick optical slices at all wavelengths.

Internalization of BSA-gold

The BSA-gold uptake studies were performed according to Kleijmeer et al., 1997. Briefly, MEFs were either incubated with BSA-gold (6 nm) for 10 min at 37°C and fixed after washing with cold medium, or incubated with BSA-gold for 10 min at 37°C, washed extensively in cold medium and further incubated at 37°C for 20 min or 50 min before fixation overnight at 4°C in 0.1M phosphate buffer (PB) containing 2% PFA and 0.2% glutaraldehyde. After fixation, cells were collected by careful scraping, centrifuged and cell pellets were washed with PB, embedded in 10% (wt/vol) gelatin and infused in 2.3 M sucrose (Liou et al., 1996). Mounted gelatin blocks were frozen in liquid nitrogen and ultrathin sections were prepared. The cryo sections were cut at -120°C using an Ultracut FCS ultracryomicrotome (Leica-Reichert) and retrieved with a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methyl cellulose. The sections were viewed at 80 kV in a JEOL 1200 EX electron microscope and pictures were taken using an Olympus (Veleta, SIS) camera.

For every time point, 40 cell profiles on each of 3 individual grids were randomly selected, and gold particles present in the endocytic structures were attributed to compartments of types 1-6 (see description in Results). For each time point, approximately 1000 beads were counted and BSA-gold counts in types 1-6 were expressed as a percentage of the total number of gold beads present in the endocytic pathway. For compartment morphology quantification, approximately 200 compartments were counted in 40 cells on each of 3 individual grids. Mean numbers of ILVs per MVBs were evaluated from 100 MVBs of 3 individual grids for each phenotype.

Colocalisation analysis

Confocal images of CTxB patches were acquired and superimposed with the distribution of selected proteins. Images were thresholded to see only the patches of CTxB and the same

threshold was then applied for all proteins. Mander's coefficient was calculated using the JACOB (Bolte and Cordelières, 2006) plug-in of ImageJ on 60 cells from each of 3 independent experiments for each protein, to show the fraction of CTxB patches which overlap the thresholded protein signal.

EGFR degradation assay

MEFs were serum-starved for 16 h in DMEM containing 2% glutamine and incubated with 100 ng/ml EGF for 30 min, 1 h, 2 h, 4 h or 6 h. For bafilomycin treatment, cells were pretreated with 100 nM bafilomycin 2 h before and during incubation with EGF. Protein bands were quantified using plot profile of ImageJ program.

Western Blotting

Cells were lysed in radioimmune precipitation assay buffer (RIPA) containing protease inhibitors (Complete, Roche Molecular). The cell lysates were cleared by a 14,000 *g* centrifugation for 20 min, proteins (20 µg of total protein per lane, 40 µg for EGFR degradation) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore). The membranes were blocked with 5% milk in TBS (Tris buffered saline) containing 0.1% Tween and incubated with the appropriate antibodies. The bands were revealed using the ECL detection reagent. Membranes were probed with primary antibodies overnight at 4°C, followed by incubation with secondary HRP-conjugated antibodies for 1 h at room temperature before revelation. Protein bands were quantified using plot profile of ImageJ program.

CTxB and Alix localization in Detergent-Resistant Membrane Domains (DRMs)

CTxB and Alix in DRMs were localized according to Blagojevic et al., 2007. Briefly, Alix ko MEFs were transfected with GFP-Alix and labelled with CTxB-TRITC or TfR-TRITC for 30 min at 4°C, washed with cold PBS and treated with 0.5% Triton X-100 for 1 min to elute detergent-sensitive membrane domains. Cells were then washed with PBS, fixed with 4% PFA and analysed with an Axiovert microscope (Zeiss).

Wound healing assay

MEFs were seeded at 5×10^5 cells per 35 mm dish. Confluent monolayers cultured in 10% FCS-containing medium were scratched using a plastic pipette tip. Cells were then washed

with PBS, fed with serum-containing medium and the wound allowed to heal at 37° C. Pictures were taken immediately after scratching and every 15 min for 48 h with a Zeiss Axiovert 200 microscope with the 5x objective. Ten cells in each of 10 fields/phenotype were tracked using Metamorph and the velocities of the cells calculated. Data were compiled from two independent experiments.

Cell spreading assay

MEFs were trypsinated, replated on coverslips precoated with 10 mg/ml fibronectin (FN), and allowed to spread for 2 h at 37°C in the presence of complete medium. Cultures were fixed and labelled with phalloidin-TRITC for 1 h to visualize their outlines. For each phenotype, 1000 randomly chosen cells were drawn using ImageJ and the mean surface area calculated.

Statistical Analyses.

Results shown are means and error bars represent standard errors of the mean (s.e.m). Experiments were repeated at least 3 times. Statistical analyses were conducted using Microsoft Excel and Prism 6 (GraphPad Software). Statistical significance was determined either by two-tailed Student's t-test (2 groups) or by one-way Anova and Dunnett's test (more than 2 groups) as appropriate.

References

- Abrami, L., L. Brandi, M. Moayeri, M.J. Brown, B.A. Krantz, S.H. Leppla, and F.G. van der Goot. 2013. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell reports*. 5:986-996.
- Bissig, C., M. Lenoir, M.C. Velluz, I. Kufareva, R. Abagyan, M. Overduin, and J. Gruenberg. 2013. Viral infection controlled by a calcium-dependent lipid-binding module in ALIX. *Dev Cell*. 25:364-373.
- Boucrot, E., A.P. Ferreira, L. Almeida-Souza, S. Debard, Y. Vallis, G. Howard, L. Bertot, N. Sauvonnet, and H.T. McMahon. 2014. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*.
- Cabezas, A., K.G. Bache, A. Brech, and H. Stenmark. 2005. Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J Cell Sci*. 118:2625-2635.
- Carlton, J.G., and J. Martin-Serrano. 2007. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*. 316:1908-1912.
- Chatellard-Causse, C., B. Blot, N. Cristina, S. Torch, M. Missotten, and R. Sadoul. 2002. Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem*. 277:29108-29115.
- Chen, B., S.C. Borinstein, J. Gillis, V.W. Sykes, and O. Bogler. 2000. The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. *J Biol Chem*. 275:19275-19281.
- Ewers, H., and A. Helenius. 2011. Lipid-mediated endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3:a004721.
- Fisher, R.D., H.Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2007. Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell*. 128:841-852.
- Futter, C.E., A. Pearce, L.J. Hewlett, and C.R. Hopkins. 1996. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*. 132:1011-1023.
- Gad, H., N. Ringstad, P. Low, O. Kjaerulff, J. Gustafsson, M. Wenk, G. Di Paolo, Y. Nemoto, J. Crun, M.H. Ellisman, P. De Camilli, O. Shupliakov, and L. Brodin. 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.
- Gandhi, H., R. Worch, K. Kurgonaite, M. Hintersteiner, P. Schwille, C. Bokel, and T. Weidemann. 2014. Dynamics and interaction of interleukin-4 receptor subunits in living cells. *Biophys J*. 107:2515-2527.
- Guichet, A., T. Wucherpennig, V. Dudu, S. Etter, M. Wilsch-Brauniger, A. Hellwig, M. Gonzalez-Gaitan, W.B. Huttner, and A.A. Schmidt. 2002. Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the Drosophila neuromuscular junction. *Embo J*. 21:1661-1672.
- Henne, W.M., H. Stenmark, and S.D. Emr. 2013. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5.
- Howes, M.T., M. Kirkham, J. Riches, K. Cortese, P.J. Walser, F. Simpson, M.M. Hill, A. Jones, R. Lundmark, M.R. Lindsay, D.J. Hernandez-Deviez, G. Hadzic, A. McCluskey, R. Bashir, L. Liu, P. Pilch, H. McMahon, P.J. Robinson, J.F. Hancock, S. Mayor, and R.G. Parton. 2010. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol*. 190:675-691.
- Jimenez, A.J., P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvire, S. Divoux, M. Piel, and F. Perez. 2014. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*. 343:1247136.

- Kim, J., S. Sitaraman, A. Hierro, B.M. Beach, G. Odorizzi, and J.H. Hurley. 2005. Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev Cell*. 8:937-947.
- Kirkham, M., and R.G. Parton. 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta*. 1746:349-363.
- Kononenko, N.L., D. Puchkov, G.A. Classen, A.M. Walter, A. Pechstein, L. Sawade, N. Kaempfer, T. Trimbuch, D. Lorenz, C. Rosenmund, T. Maritzen, and V. Haucke. 2014. Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*. 82:981-988.
- Lakshminarayanan, R., C. Wunder, U. Becken, M.T. Howes, C. Benzing, S. Arumugam, S. Sales, N. Ariotti, V. Chambon, C. Lamaze, D. Loew, A. Shevchenko, K. Gaus, R.G. Parton, and L. Johannes. 2014. Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*. 16:595-606.
- Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah, and A. Dautry-Varsat. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell*. 7:661-671.
- Le Blanc, I., P.P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demarex, J. Faure, R. Sadoul, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 2005. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol*. 7:653-664.
- Liou, W., H.J. Geuze, and J.W. Slot. 1996. Improved structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem. Cell Biol*. 106:41-58.
- Llobet, A., J.L. Gallop, J.J. Burden, G. Camdere, P. Chandra, Y. Vallis, C.R. Hopkins, L. Lagnado, and H.T. McMahon. 2011. Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *J Neurosci*. 31:8512-8519.
- Lynch, D.K., S.C. Winata, R.J. Lyons, W.E. Hughes, G.M. Leharbach, V. Wasinger, G. Corthals, S. Cordwell, and R.J. Daly. 2003. A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 278:21805-21813.
- Mahul-Mellier, A.L., F.J. Hemming, B. Blot, S. Fraboulet, and R. Sadoul. 2006. Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death in vivo. *J Neurosci*. 26:542-549.
- Mahul-Mellier, A.L., F. Strappazzon, A. Petiot, C. Chatellard-Causse, S. Torch, B. Blot, K. Freeman, L. Kuhn, J. Garin, J.M. Verna, S. Fraboulet, R. Sadoul, and F.J. Hemming. 2008. Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death. *J Biol Chem*. 283:34954-34965.
- Margadant, C., H.N. Monsuur, J.C. Norman, and A. Sonnenberg. 2011. Mechanisms of integrin activation and trafficking. *Curr Opin Cell Biol*. 23:607-614.
- Matsuo, H., J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N.S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R.G. Parton, F. Vilbois, and J. Gruenberg. 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*. 303:531-534.
- Mayor, S., R.G. Parton, and J.G. Donaldson. 2014. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6.
- McCullough, J., R.D. Fisher, F.G. Whitby, W.I. Sundquist, and C.P. Hill. 2008. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:7687-7691.
- Milosevic, I., S. Giovedi, X. Lou, A. Raimondi, C. Collesi, H. Shen, S. Paradise, E. O'Toole, S. Ferguson, O. Cremona, and P. De Camilli. 2011. Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron*. 72:587-601.

- Missotten, M., A. Nichols, K. Rieger, and R. Sadoul. 1999. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ.* 6:124-129.
- Mobius, W., E. van Donselaar, Y. Ohno-Iwashita, Y. Shimada, H.F. Heijnen, J.W. Slot, and H.J. Geuze. 2003. Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic.* 4:222-231.
- Morita, E., V. Sandrin, H.Y. Chung, S.G. Morham, S.P. Gygi, C.K. Rodesch, and W.I. Sundquist. 2007. Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *Embo J.* 26:4215-4227.
- Pan, S., R. Wang, X. Zhou, J. Corvera, M. Kloc, R. Sifers, G.E. Gallick, S.H. Lin, and J. Kuang. 2008. Extracellular Alix regulates integrin-mediated cell adhesions and extracellular matrix assembly. *Embo J.* 27:2077-2090.
- Petrelli, A., G.F. Gilestro, S. Lanzardo, P.M. Comoglio, N. Migone, and S. Giordano. 2002. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature.* 416:187-190.
- Pires, R., B. Hartlieb, L. Signor, G. Schoehn, S. Lata, M. Roessle, C. Moriscot, S. Popov, A. Hinz, M. Jamin, V. Boyer, R. Sadoul, E. Forest, D.I. Svergun, H.G. Gottlinger, and W. Weissenhorn. 2009. A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure.* 17:843-856.
- Ren, X., and J.H. Hurley. 2011. Proline-rich regions and motifs in trafficking: from ESCRT interaction to viral exploitation. *Traffic.* 12:1282-1290.
- Renard, H., M. Simunovic, J. Lemiere, E. Boucrot, M.D. Garcia-Castillo, S. Arumugam, V. Chambon, C. Lamaze, C. Wunder, A.K. Kenworthy, A.A. Schmidt, H.T. McMahon, C. Sykes, P. Bassereau, and L. Johannes. 2014. Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature.*
- Ringstad, N., Y. Nemoto, and P. De Camilli. 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.
- Rodighiero, C., Y. Fujinaga, T.R. Hirst, and W.I. Lencer. 2001. A cholera toxin B-subunit variant that binds ganglioside G(M1) but fails to induce toxicity. *J Biol Chem.* 276:36939-36945.
- Rusten, T.E., T. Vaccari, and H. Stenmark. 2012. Shaping development with ESCRTs. *Nat Cell Biol.* 14:38-45.
- Sadoul, R. 2006. Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse. *Bio. Cell.* 98:69-77.
- Scheffer, L.L., S.C. Sreetama, N. Sharma, S. Medikayala, K.J. Brown, A. Defour, and J.K. Jaiswal. 2014. Mechanism of Ca(2+)-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature communications.* 5:5646.
- Schuske, K.R., J.E. Richmond, D.S. Matthies, W.S. Davis, S. Runz, D.A. Rube, A.M. van der Blik, and E.M. Jorgensen. 2003. Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron.* 40:749-762.
- Sigismund, S., V. Algisi, G. Nappo, A. Conte, R. Pascolutti, A. Cuomo, T. Bonaldi, E. Argenzio, L.G. Verhoef, E. Maspero, F. Bianchi, F. Capuani, A. Ciliberto, S. Polo, and P.P. Di Fiore. 2013. Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate. *Embo J.* 32:2140-2157.
- Sigismund, S., E. Argenzio, D. Tosoni, E. Cavallaro, S. Polo, and P.P. Di Fiore. 2008. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell.* 15:209-219.

- Soubeyran, P., K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, W.Y. Langdon, and I. Dikic. 2002. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*. 416:183-187.
- Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H.G. Gottlinger. 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*. 114:689-699.
- Trioulier, Y., S. Torch, B. Blot, N. Cristina, C. Chatellard-Causse, J.M. Verna, and R. Sadoul. 2004. Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem*. 279:2046-2052.
- Verstreken, P., O. Kjaerulff, T.E. Lloyd, R. Atkinson, Y. Zhou, I.A. Meinertzhagen, and H.J. Bellen. 2002. Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell*. 109:101-112.
- Vogt, G., A. Chapgier, K. Yang, N. Chuzhanova, J. Feinberg, C. Fieschi, S. Boisson-Dupuis, A. Alcais, O. Filipe-Santos, J. Bustamante, L. de Beaucoudrey, I. Al-Mohsen, S. Al-Hajjar, A. Al-Ghonaum, P. Adimi, M. Mirsaeidi, S. Khalilzadeh, S. Rosenzweig, O. de la Calle Martin, T.R. Bauer, J.M. Puck, H.D. Ochs, D. Furthner, C. Engelhorn, B. Belohradsky, D. Mansouri, S.M. Holland, R.D. Schreiber, L. Abel, D.N. Cooper, C. Soudais, and J.L. Casanova. 2005. Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet*. 37:692-700.
- Watanabe, S., B.R. Rost, M. Camacho-Perez, M.W. Davis, B. Sohl-Kielczynski, C. Rosenmund, and E.M. Jorgensen. 2013. Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*. 504:242-247.
- Watanabe, S., T. Trimbuch, M. Camacho-Perez, B.R. Rost, B. Brokowski, B. Sohl-Kielczynski, A. Felies, M.W. Davis, C. Rosenmund, and E.M. Jorgensen. 2014. Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*. 515:228-233.
- Wolf, A.A., Y. Fujinaga, and W.I. Lencer. 2002. Uncoupling of the cholera toxin-G(M1) ganglioside receptor complex from endocytosis, retrograde Golgi trafficking, and downstream signal transduction by depletion of membrane cholesterol. *J Biol Chem*. 277:16249-16256.

Figure legends

Figure 1: EGFR degradation is delayed in Alix ko cells.

(A-B) Serum-starved wt or Alix ko MEFs were incubated with 100 ng/ml EGF at 37°C for the indicated times. EGFR was revealed by immunoblotting (A) and band intensities estimated (B) using ImageJ software. n=5; ** P<0.02.

Figure 2: Endocytosis is delayed in Alix ko cells

(A) EM quantification of BSA-gold particles endosomal trafficking. MEFs were incubated with BSA-gold for 10 min at 37°C and fixed immediately (top panel), or washed and further incubated at 37°C for 20 min (middle panel) or 50 min (bottom panel). 1000 gold particles were counted for each condition and were attributed to each compartment type. CryoEM pictures show typical profiles of the different compartments. type 1: plasma membrane invaginations, type 2: endocytic vesicles, type 3: early endosomal compartments, type 4: multivesicular bodies (MVB), type 5: late endosomes/ lysosomes. Scale bars: 120nm. *P<0.05; **P<0.02.

(B) Wt and ko MEFs were incubated 10 min with dextran-TRITC at 37°C, washed and fixed. Mean fluorescent values per cell were estimated using ImageJ (120 cells, n=3; **P<0.02).

(C) MEFs were stained for 5 min with fluorescent WGA at 4°C, washed and incubated 5 min at 37°C. Wt or Alix ko MEFs were fixed after acid-stripping and mean fluorescent values per cell estimated using ImageJ. (70 cells; n= 3; ***P<0.001).

Figure 3: CIE is selectively disrupted in Alix ko cells while CME is unaffected.

A) Representative photographs of wt and Alix ko MEFs after endocytosis of EGF, Tf, GPI-GFP, $\beta 1$ integrin and IL2R β . Scale bars: 20 μ m. Serum-starved MEFs were incubated with EGF-TRITC (EGF, 2 or 100 ng/ml) or transferrin-TRITC (Tf) at 4°C, followed by 10 min incubation at 37°C. GPI-GFP or IL2R β -GFP expressing-MEFs were incubated with anti-GFP antibodies at 4°C, followed by 5 min incubation at 37°C. To follow $\beta 1$ integrin endocytosis, cells were incubated at 4°C with anti-active- $\beta 1$ integrin antibodies for 45 min followed by 10 min incubation at 37°C. In both cases cells were acid stripped and fixed before revelation by a secondary antibody. (B) Mean fluorescence values per cell were estimated using ImageJ (100 cells for EGF, Tf and $\beta 1$ integrin, 60 cells for IL2R β and GPI-GFP; n=3; **P<0.02; ***P<0.001).

Figure 4: CIE but not CME of CTxB is impaired in Alix ko cells.

A) Representative photographs of CTxB uptake by wt and Alix ko MEFs. Reduced CTxB-TRITC endocytosis by Alix ko cells is decreased by chlorpromazine (chlorpro) but not by filipin. Cells were incubated with filipin or chlorpromazine, both before and during CTxB-TRITC internalization.

B) Quantification of the experiment shown in A). Mean fluorescence values per cell were calculated using ImageJ (100 cells; n=3; *P< 0.05; **P< 0.02; ***P<0.001).

Figure 5: Alix and endophilin A2 relocate to CTxB labelled membrane patches.

A) Recruitment of Alix to CTxB patches. Upper panel: Alix ko MEFs expressing GFP-Alix were incubated or not (untreated) for 20 min with CTxB-TRITC (red) at 4°C. Lower panel Alix ko MEFs expressing GFP-Alix were incubated with CTxB at 4°C as in upper panel followed by 1 min at 37°C to allow endocytosis. Scale bar: 10 µm.

B) Alix is not recruited to membrane patches containing TfR. Alix ko MEFs expressing GFP-Alix were incubated for 20 min with Tf-TRITC at 4°C and fixed. Scale bar: 10 µm. Graph shows the percentage of Tf labelled patches colocalizing with GFP or Alix (70 cells; n=4). Quantifications were performed using ImageJ.

C) Upper panels: Endophilin A2 recruitment to CTxB patches in both wt and ko cells. Wt MEFs and Alix ko MEFs expressing Myc-endophilin-A2 (endo A2), were incubated with CTxB-TRITC for 20 min at 4°C before immunostaining with anti-Myc antibodies (green). Lower panel Endophilin A2 and Alix colocalize to CTxB patches. Alix ko MEFs expressing GFP-Alix (green) and Myc-endophilin were incubated with CTxB-TRITC (red) for 20 min at 4°C before double immunolabelling with anti-Myc (blue) antibodies. Scale bars: 10 µm.

D) Graph shows the percentage of CTxB labelled patches colocalizing with GFP, Alix, AlixΔendo or endophilin-A2 in wt (black) or Alix ko cells (gray). The number of CTxB positive patches containing GFP, GFP-Alix or immunolabelled with anti-Flag (AlixΔendo) or anti-Myc antibodies (endophilin A2) was quantified using ImageJ. (60 cells n= 3; **P< 0.02; ***P<0.001).

Figure 6: Alix and endophilin A2 mediate CIE of CTxB.

A) Alix mediated CIE of CTxB requires binding to endophilins.

Wt, Alix ko or Alix ko cells transduced with viruses encoding Alix wt (Alix ko+Alix) or AlixΔendo (Alix ko+AlixΔendo) were incubated with CTxB-TRITC during 20 min at 4°C, followed by 5 min at 37°C and acid stripping. Scale bar: 10 µm.

B) Quantification of the experiments shown in A). Mean fluorescence values per cell were estimated using ImageJ. (120 cells; n=3; ***P<0.001).

C) Endophilin A2 and Alix act in a common pathway in CIE of CTxB.

Wt and Alix ko MEFs were transfected with shGFP endophilin (shGFP-endo) or shGFP scramble (shGFP-scramble) vectors during 72 h. Cells were incubated with CTxB-TRITC for 20 min at 4°C, followed by 5 min at 37°C and acid stripping. Stars show the nucleus of transfected cells. Scale bar: 10 µm.

D) Quantification of the experiments shown in C). Mean fluorescence values per transfected cell were calculated using ImageJ software (80 cells; n=3 ***P< 0.001).

Figure 7: A) Decreased velocity of Alix ko cells in a wound healing assay. B) Rescue experiments using Alix ko cells transduced with Alix (Alix ko+Alix) or AlixΔendophilin (Alix ko+AlixΔendo). Live cells were observed for 20 h while migrating to close the gap. Velocities were measured using Metamorph (100 cells; n=2; ***P< 0.001). Photographs show typical recordings of migration tracks. Scale bars: 50 µm.

C) Alix knock-down impairs STAT5 phosphorylation induced by IL-2. Immunoblots for tyrosine phosphorylation status of STAT5 in EBV-B cells transfected with pSuper empty or pSuper shAlix prior to IL-2 stimulation for 10 minutes and band intensities estimated using ImageJ software. (n=3; ***P<0.001).

Figure S1: The distribution and size of endosomes is not significantly altered in Alix ko cells. Wt and Alix ko MEFs were immunolabelled with different endosomal markers: EEA1 for early endosomes, Rab 11 for recycling endosomes, LAMP1 for late endosomes and lysosomes and LBPA for multivesicular bodies. Scale bar: 15 µm.

Figure S2: Electron microscopy quantification of the different types of endosomes in wt and Alix ko cells. (A) CryoEM pictures show endosomal compartments labelled with BSA-gold in wt (upper panel) and Alix ko MEFs (bottom panel). (B) Quantification of each type of endosome in 30 cells on 2 individual grids in wt and Alix ko MEFs. Type 3, 4 and 5 structures represent early endosomal compartments, multivesicular bodies (MVB) and late endosomes/ lysosomes respectively. (C-D) Mean diameter of MVBs (C) and lysosomes (D); n=200 for each cell type. (E) Average number of vesicles per MVB quantified in 100 MVBs (**P< 0.02). (F) Mean ILV diameter in 200 MVBs.

Figure S3: Alix depletion impairs cell spreading. Dissociated MEFs were allowed to adhere to fibronectin-coated glass for 2 h. Cells were stained with phalloidin and the cell area calculated using ImageJ (1000 cells; n= 3; *P< 0.05). Scale bars: 20 μ m.

Figure S4: A) CTxB binding does not differ between Alix ko and wt MEFs.

Wt and Alix ko MEFs were incubated with CTxB-TRITC during 20 min at 4°C and mean fluorescence values per cell were estimated using ImageJ (100 cells; n=3).

B) CTxB endocytosed by Alix ko cells is targeted to the Golgi apparatus as in the case of wt cells. Cells were incubated with CTxB-TRITC during 20 min at 4°C, washed and further incubated for 30 min at 37°C before fixation. The Golgi apparatus was immunostained using anti GM130 antibody (green). Scale bar: 10 μ m.

C) Alix colocalises to CTxB-Triton-X100-insoluble membrane patches. Alix ko MEFs expressing GFP-Alix were incubated with CTxB-TRITC or Tf-TRITC during 20 min at 4°C. Cells were then incubated 1 min at 4°C with 0.5% Triton-X100, fixed and analyzed. Scale bar: 10 μ m.

Figure S5: (A) Expression levels of Alix in wt, Alix ko or Alix ko cells transduced with viruses encoding Alix wt (Alix ko+Alix) or Alix Δ endo (Alix ko+Alix Δ endo) estimated by Western blot analysis using anti Alix polyclonal antibody. B) endophilin expression in wt and Alix ko MEFs and in N2a (C) cells transfected 72 h with shGFP-scramble or shGFP-endophilin plasmids.

Figure S6: CME of CTxB by wt MEFs is independent of endophilin A2. Wt MEFs transfected with an sh vector against endophilin (shGFP-endophilin, hatched bars) or control (shGFP-scramble, black bars) were incubated with CTxB for 20 min at 4°C followed by 5 min at 37°C before acid stripping. Cells were incubated with filipin to disrupt CIE or chlorpromazine (chlorpro) to disrupt CME, prior and during CTxB internalization. (40 cells; n=2 *P<0.05; **P<0.02).

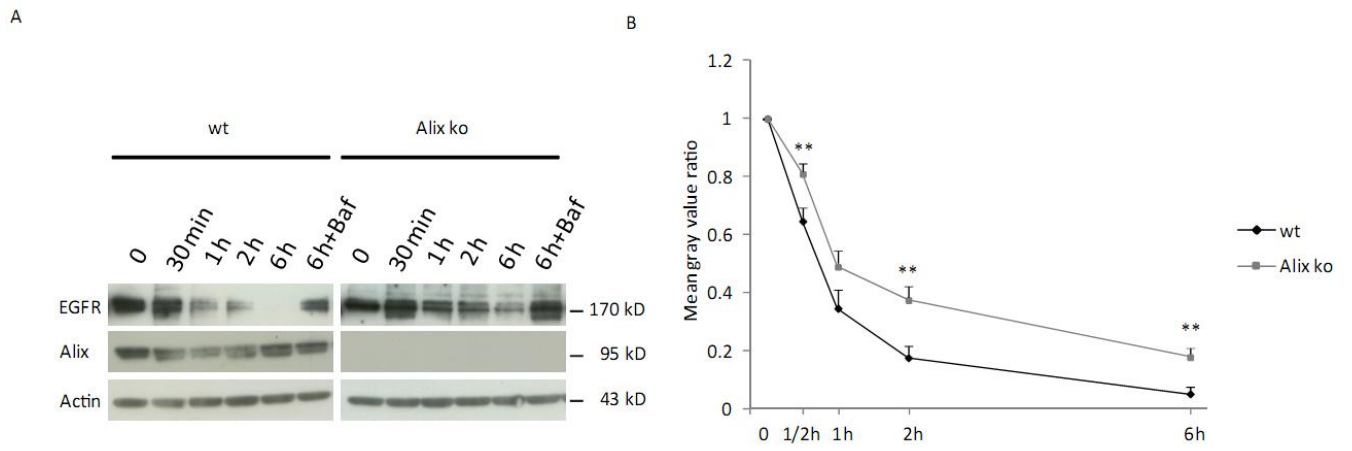


Figure 1

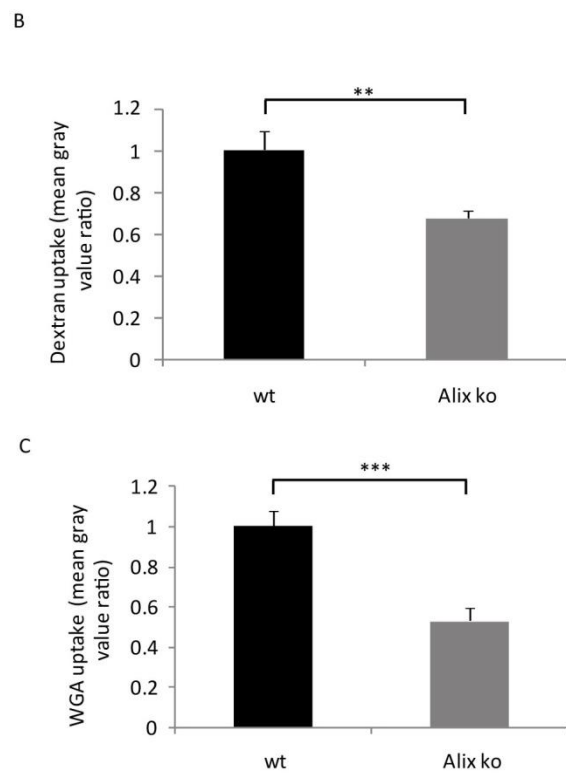
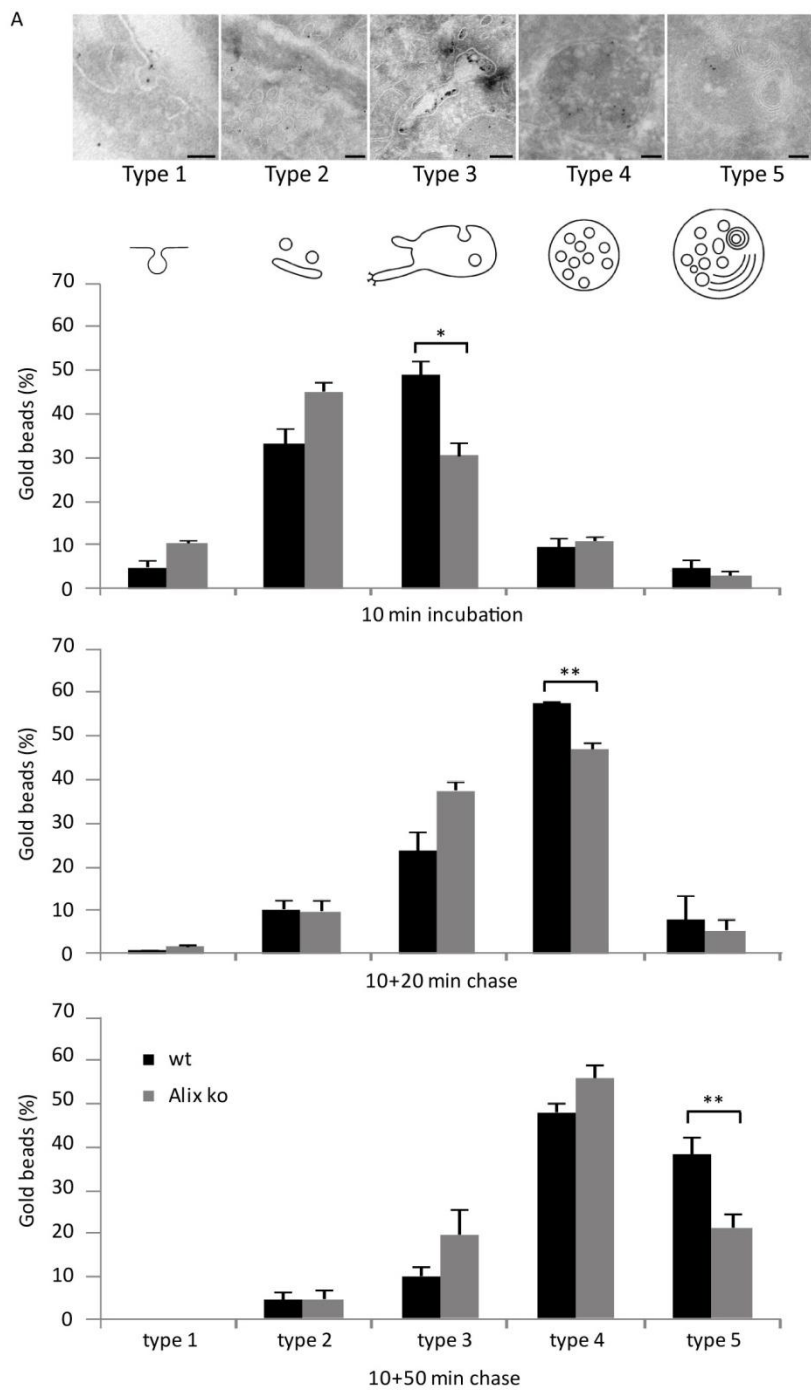


Figure 2

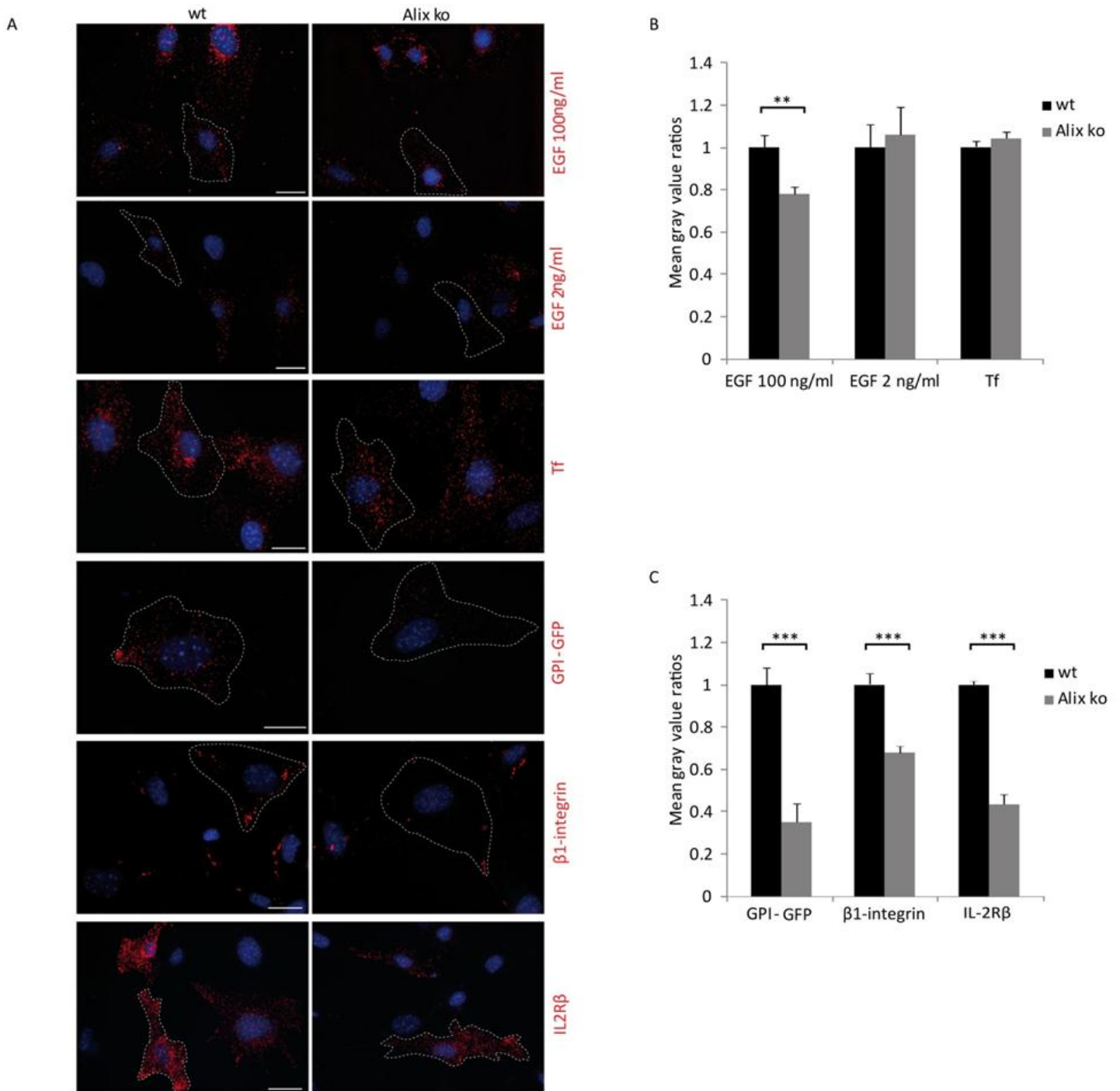
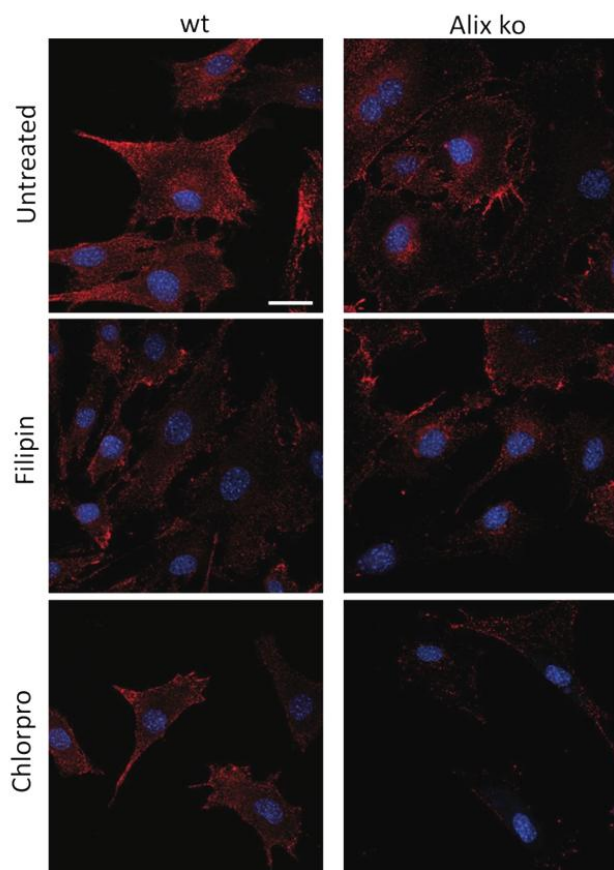


Figure 3

A



B

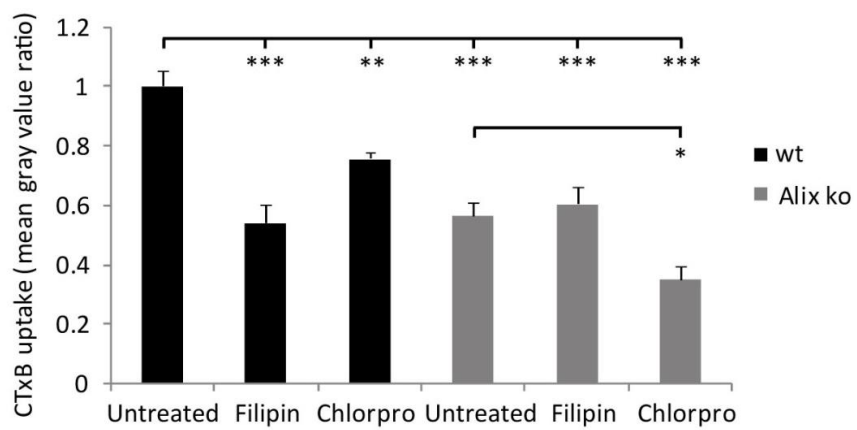


Figure 4

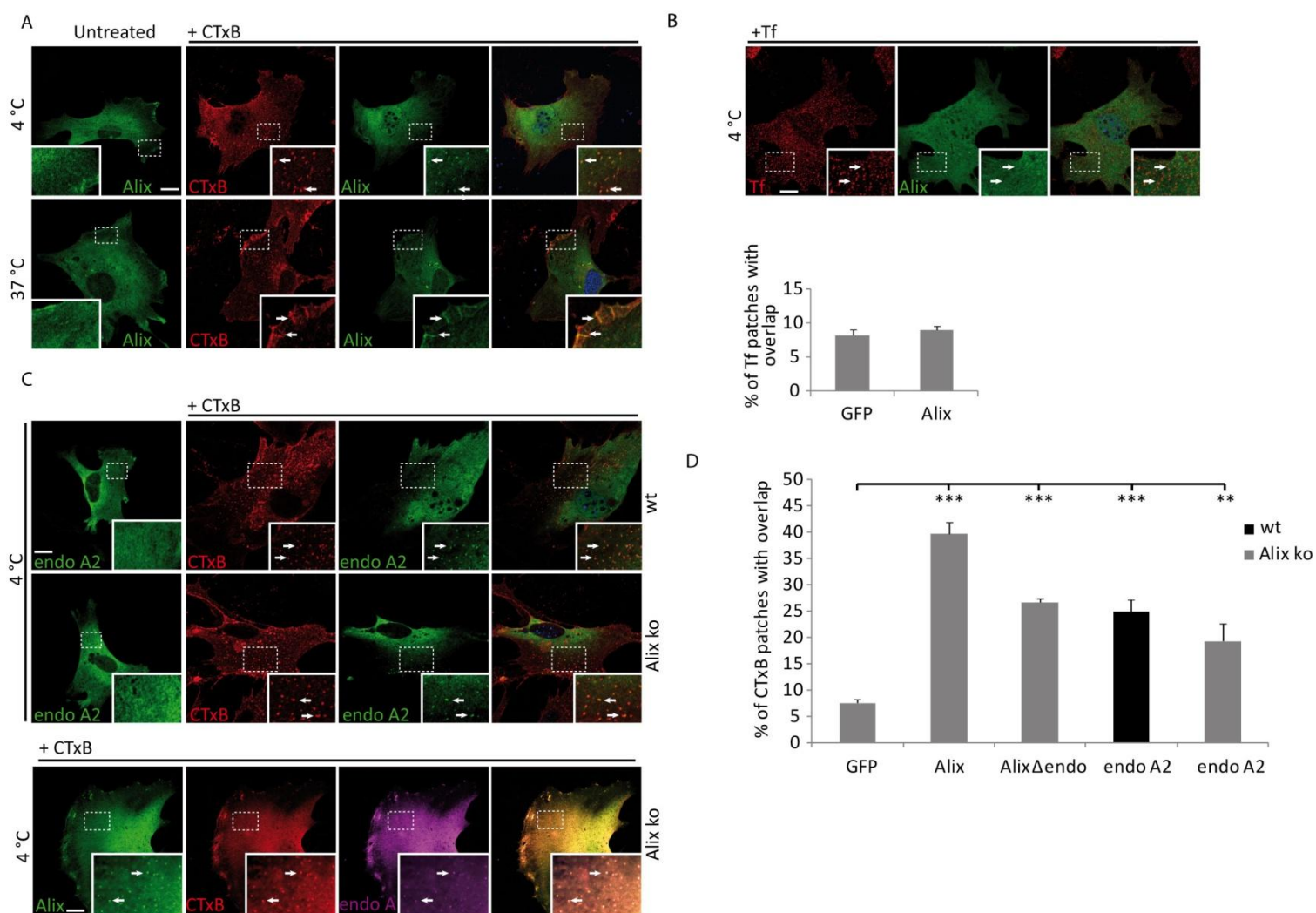


Figure 5

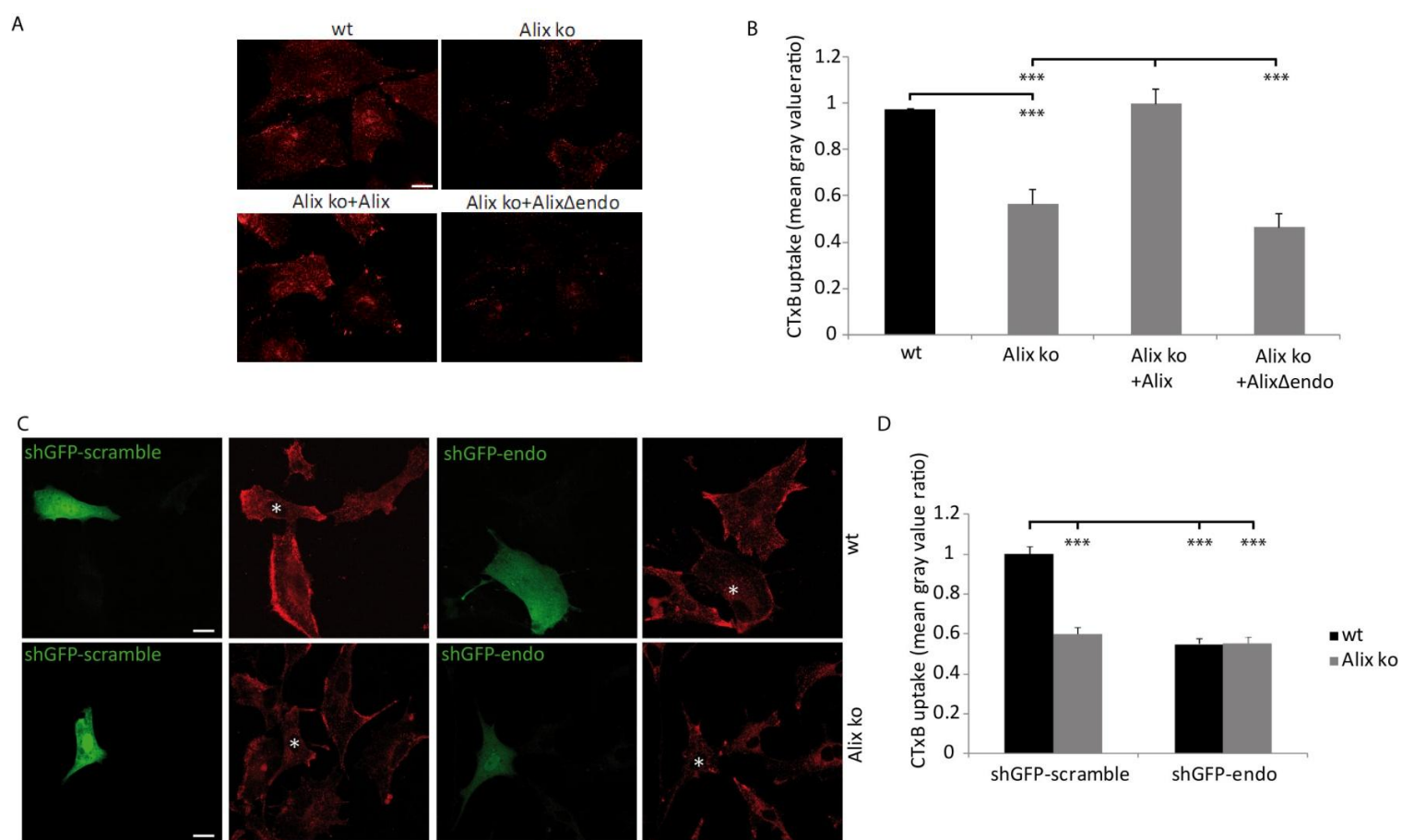
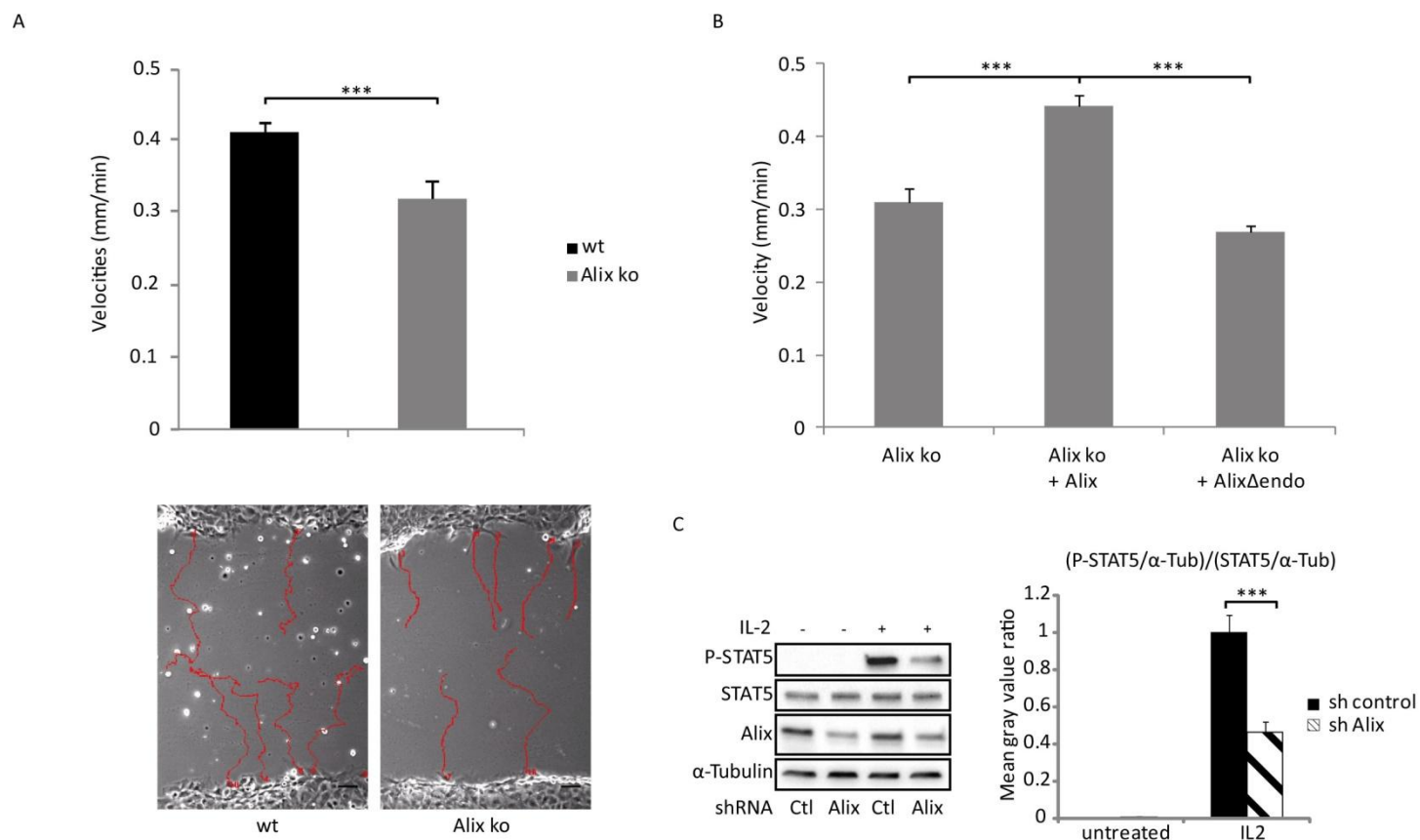


Figure 6



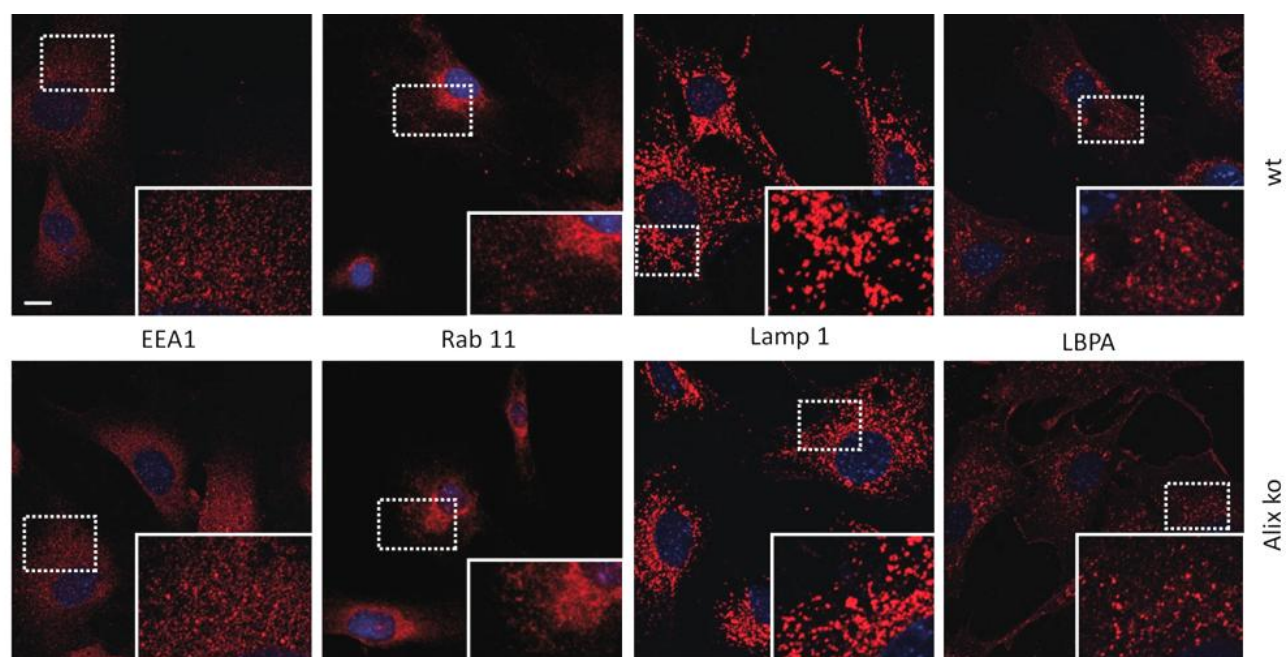


Figure S1

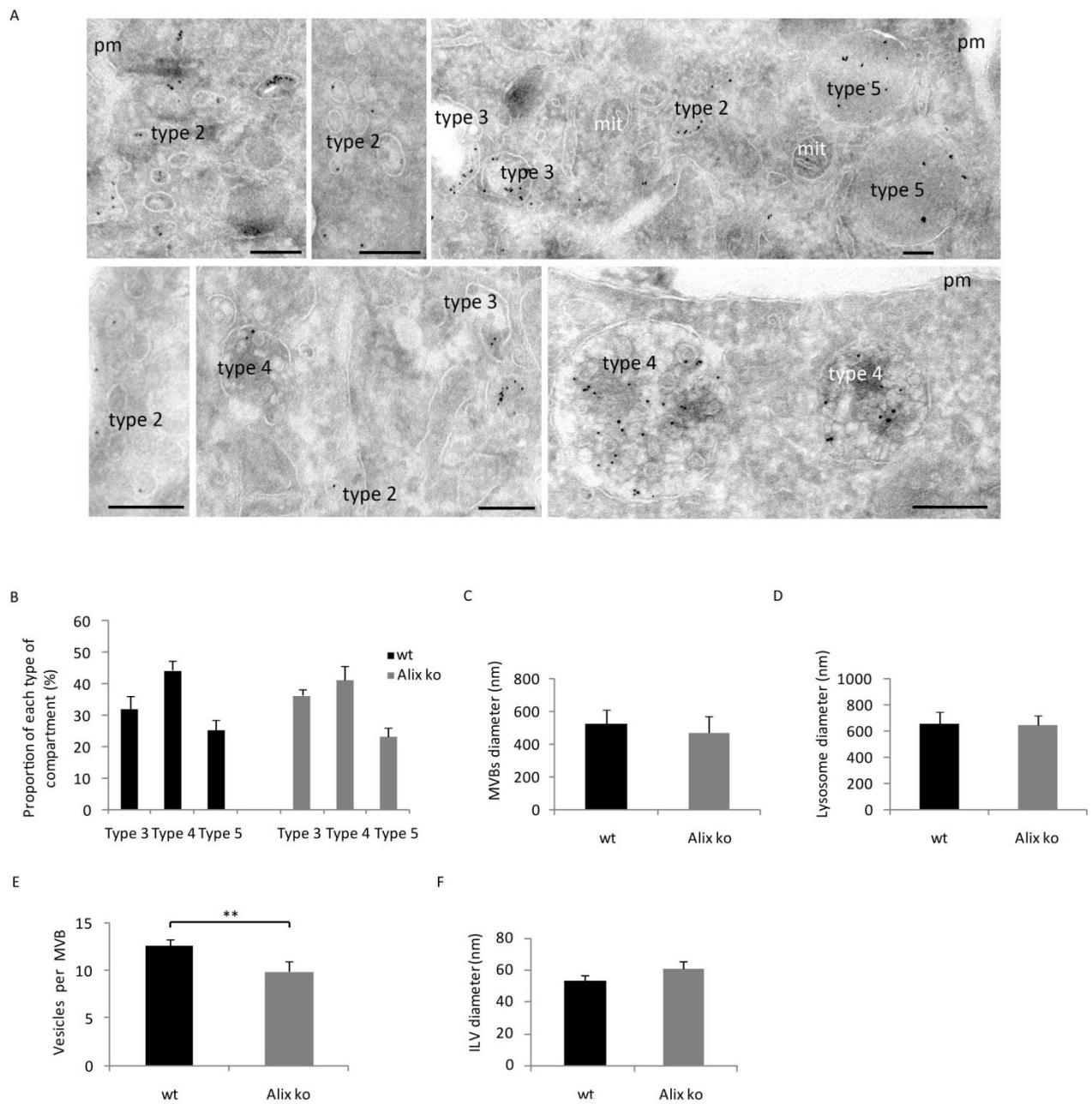


Figure S2

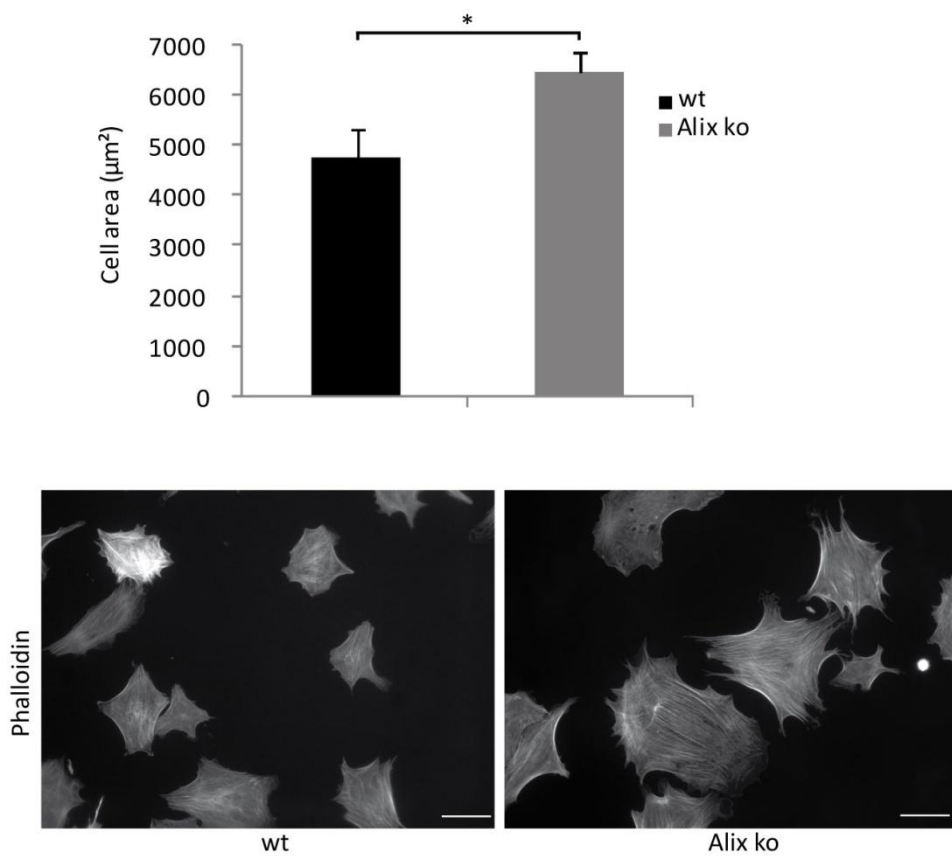


Figure S3

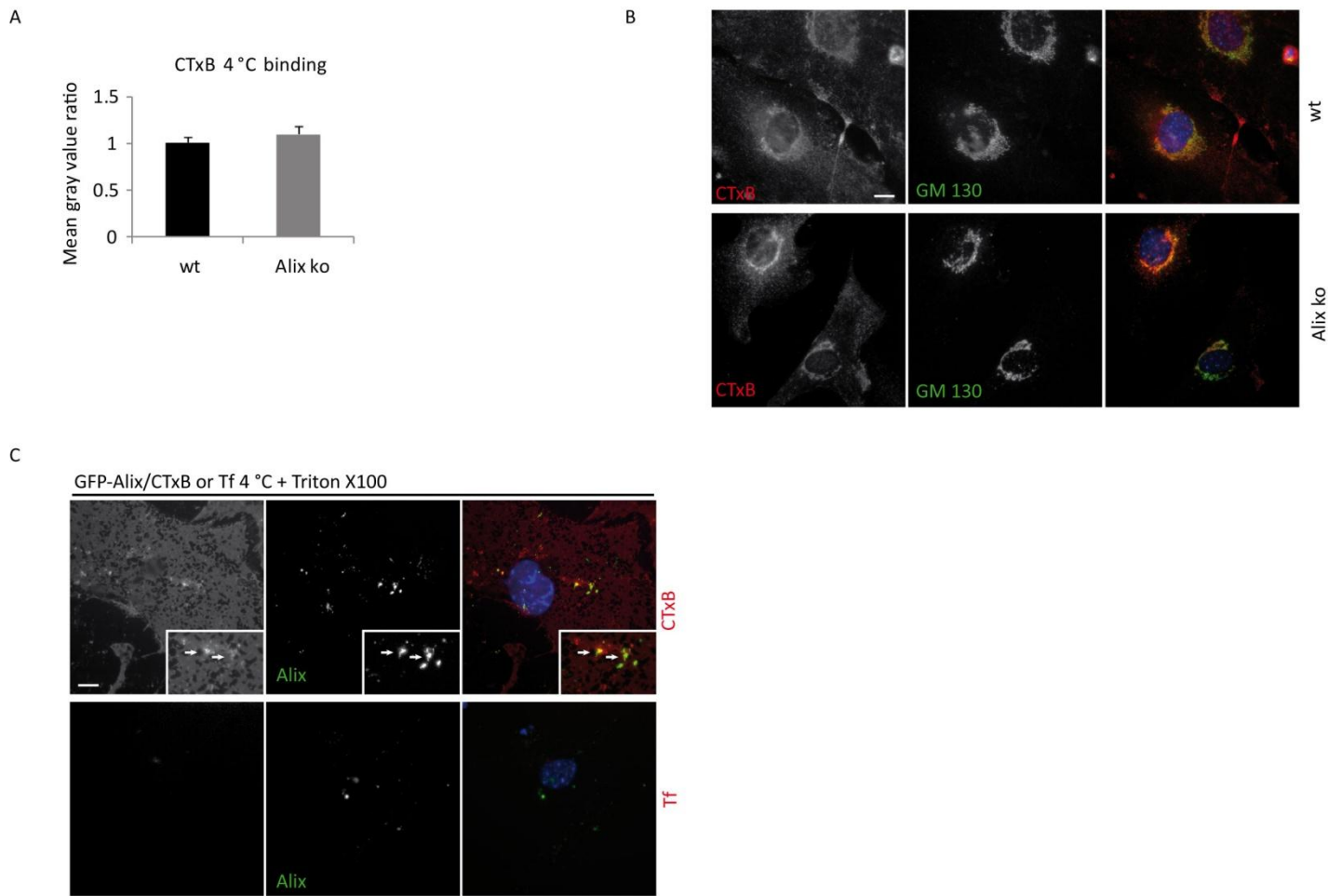


Figure S4

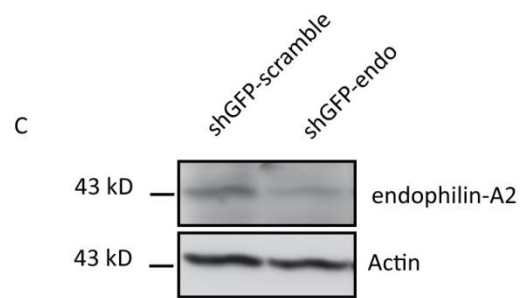
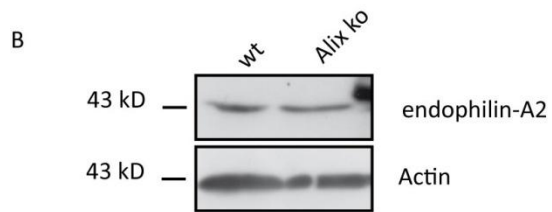
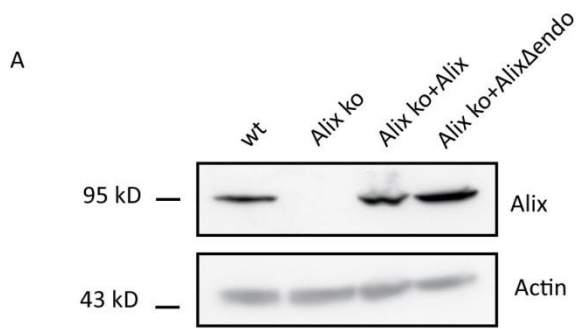


Figure S5

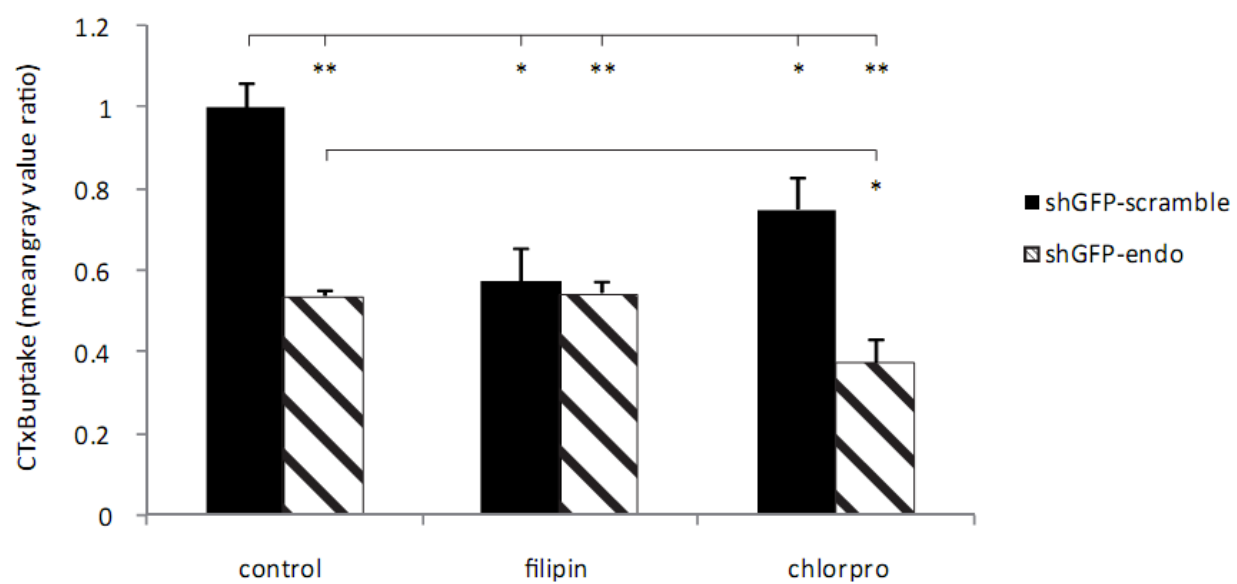


Figure S6

2. Résultats complémentaires de l'étude

2.1 Le trafic antérograde n'est pas affecté par l'absence d'Alix

L'expérience de pulse chase utilisant la BSA-gold, décrite dans l'article (Figure 39), nous a permis de mettre en évidence qu'il y a un retard de l'internalisation mais que le trafic rétrograde, c'est-à-dire en provenance de la membrane plasmique, est normal en absence de la protéine Alix. Nous avons également caractérisé le transport antérograde, c'est-à-dire du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique, dans les MEF ko Alix. Pour cela, nous avons utilisé la protéine VSVG (protéine G du Virus de la Stomatite Vésiculaire) mutée et fusionnée à la GFP. La protéine VSVG est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique (ER) et contient une séquence d'adressage à la membrane plasmique. Ainsi, elle est donc exportée du ER, transite par l'appareil de golgi avant d'atteindre la membrane plasmique grâce à un transport vésiculaire. Afin de synchroniser la sortie de la VSVG du ER, nous avons utilisé la protéine mutée, qui est thermosensible. Ainsi, à la température de 40°C, la protéine est mal repliée et reste bloquée dans l'ER et lorsque la température diminue à 32°C, la protéine change de conformation et acquiert la capacité d'être exportée du RE.

La figure montre qu'à 40°C la protéine est dans le RE, le passage à 32°C induit le trafic de

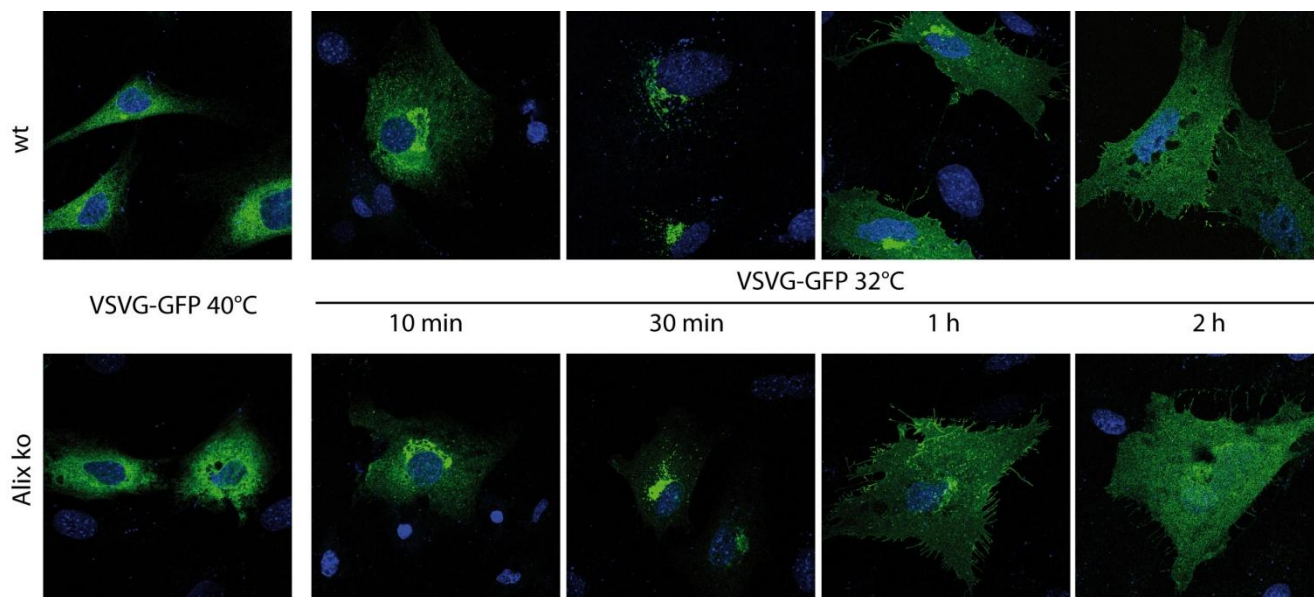


Figure 39: Le trafic antérograde est normal dans les MEF ko Alix

Les cellules ont été transfectées avec la protéine VSV-G GFP thermosensible et placées à 40°C pendant 12h, afin de permettre l'accumulation de la protéine dans le réticulum endoplasmique. Les cellules ont ensuite été placées à 32°C, afin d'induire le trafic de la protéine par l'appareil de golgi (pic à 30 min) avant d'atteindre la membrane plasmique.

VSVG-GFP qui atteint rapidement l'appareil de golgi (10 min) pour y être majoritairement retrouvée au bout de 30 min. Après 1 heure à 32°C, la protéine est présente à la membrane plasmique aussi bien dans les cellules wt que dans les cellules ko Alix et après 2 heures à 32°C, elle est essentiellement présente à la membrane plasmique.

Ce test suggère donc que le trafic antérograde, n'est pas bloqué dans les MEF ko Alix, puisque le VSV-G est bien présent à la membrane plasmique après 1 heure à 32°C, comme dans les cellules contrôles (Figure 39).

2.2 Le LBPA et le cholestérol ne sont pas perturbés dans les MEF ko Alix

Il a été suggéré que l'extinction d'Alix, par des siRNA dans des cellules BHK ou HeLa, affecte de façon drastique le niveau de LBPA détectable dans ces cellules (Matsuo et al., 2004 ; Cabezas et al., 2005) ainsi que celui du cholestérol (Chevallier et al., 2008). Nous avons donc réalisé un immunomarquage du LBPA dans les MEF wt et ko (voir article) ainsi qu'un marquage du cholestérol par la filipine. Les résultats que nous avons obtenus montrent un niveau comparable à la fois du LBPA et du cholestérol dans les cellules ko Alix par rapport aux cellules wt.

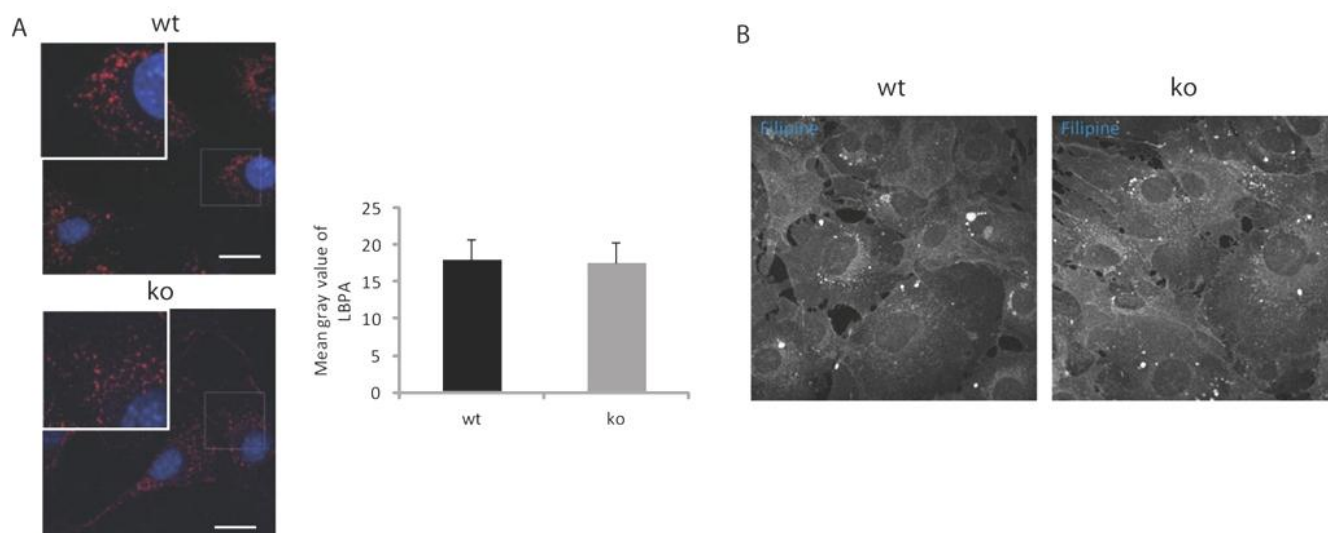


Figure 40: Le niveau de LBPA et de cholestérol est comparable entre les cellules wt et les cellules ko Alix.

A) Les MEF wt et ko Alix ont été marquées par un anticorps dirigé contre le LBPA (6C4). L'intensité moyenne de fluorescence par cellule a été mesurée sur 100 cellules par phénotype via image J. Barre d'échelle : 10 μ m

B) Les cellules wt et ko Alix ont été marquées par la filipine, qui se lie au cholestérol et fluoresce dans le bleu. Barre d'échelle : 10 μ m

Ces résultats (Figure 40) montrent que dans les MEF ko Alix, contrairement à ce qui a été observé par l'utilisation de siRNA dirigés contre Alix, la distribution ou l'expression du LBPA et du cholestérol ne sont pas affectées par la déplétion d'Alix.

2.3 Alix s'associe à la membrane plasmique

Alix est une protéine diffuse dans le cytoplasme et parfois, retrouvée concentrée aux bord de la cellule au niveau de « ruffles ». Nous avons voulu voir si Alix pouvait être associée à la membrane au niveau de ces ruffles (entouré en rouge sur la première image de droite, Figure 41). Pour cela, nous avons utilisé le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) qui consiste à éteindre (bleaching) la fluorescence des protéines dans une zone donnée (ROI : Region Of Interest) à l'aide d'une stimulation laser brève, à forte puissance. Le recouvrement de fluorescence (recovery) dans la ROI est ensuite analysé et correspond au remplacement des molécules « bleachées » par de nouvelles molécules fluorescentes. Une protéine diffuse aura un temps de recovery extrêmement court (milliseconde) alors que ce temps sera beaucoup plus long si la protéine fait partie d'un complexe protéique ou est associée à des structures membranaires. De plus, dans le cas de protéines s'associant à la membrane (ou à des protéines membranaires), on constate une fraction immobile, qui correspond à un pool de protéines ne pouvant être remplacée rapidement par diffusion et dont la durée de récupération dépend entre autre du coefficient d'association/dissociation de la protéine avec les structures. Les résultats obtenus dans les MEF ko Alix transfectées avec GFP-Alix, montrent qu'Alix est diffuse dans le cytosol (temps de recovery très court et absence de fraction immobile) alors qu'elle semble associée à la membrane plasmique au niveau des ruffles (Figure 41). En effet, sa mobilité moléculaire est réduite au niveau des ruffles (temps de demi-recovery de 20 secondes) et on constate une fraction immobile de l'ordre de 15% (Figure 41). Ces résultats montrent que la protéine Alix est associée à la membrane plasmique (soit directement soit à des protéines membranaires) au niveau des ruffles, ce qui suggère qu'elle pourrait assurer des fonctions à la membrane plasmique.

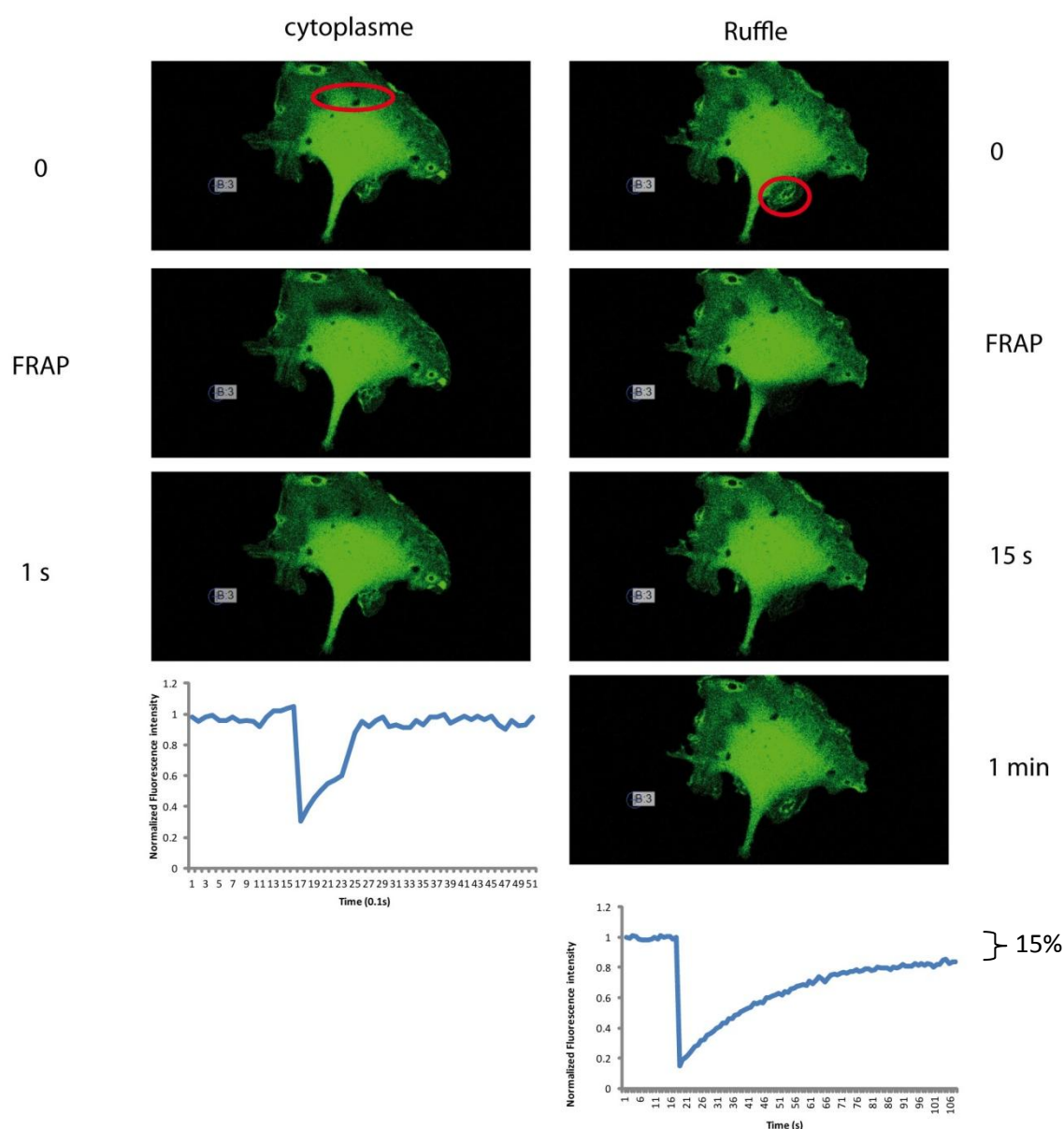


Figure 41: GFP-Alix interagit avec la membrane plasmique.

Les MEF ko Alix ont été transfectées 24h avec la construction GFP-Alix et utilisées pour des expériences de FRAP à 24°C. La fluorescence a été déplétée au niveau du cytoplasme (gauche, ovale rouge) ou au bord de la cellule (droite, ovale rouge). Le retour de la fluorescence dans ces zones a ensuite été analysé. Pour cela, l'intensité de fluorescence au cours du temps a été mesurée via imageJ et normalisée par rapport au bleaching. Les courbes représentent l'intensité de fluorescence en fonction du temps.

2.4 Alix est présente dans les DRM

Nous venons de voir qu'Alix interagit avec des régions spécifiques de la membrane plasmique. Les CIE sont caractérisées par une internalisation des cargos qui a lieu au niveau de régions caractéristiques de la membrane plasmique ; les DRM (ou radeaux lipidiques). Ainsi, le glycosphingolipide GM1 regroupé par la fixation de la CTxB est enrichi dans ces DRM (Fra et al., 1994). Nous avons montré qu'Alix est recrutée aux patchs de la CTxB à la membrane plasmique (article Figure 5). De plus, nous avons montré en microscopie de fluorescence, que ces patchs qui concentrent Alix et la CTxB à 4°C sont résistants à un traitement par détergent (triton) (article Figure S3), ce qui confirme qu'il s'agit bien de DRM. Afin de valider ces résultats, nous avons analysé la présence d'Alix au niveau des DRM par biochimie. Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'une petite proportion de la protéine Alix est bien présente au niveau des fractions de densité correspondante aux DRM (fraction 4,5), marquées par la flotilline-1 (Figure 42). Il serait intéressant de voir si l'ajout de CTxB sur les cellules augmente la présence d'Alix dans les fractions correspondantes aux DRM. Il serait également intéressant d'analyser via ce protocole, la présence des partenaires d'Alix au niveau des DRM.

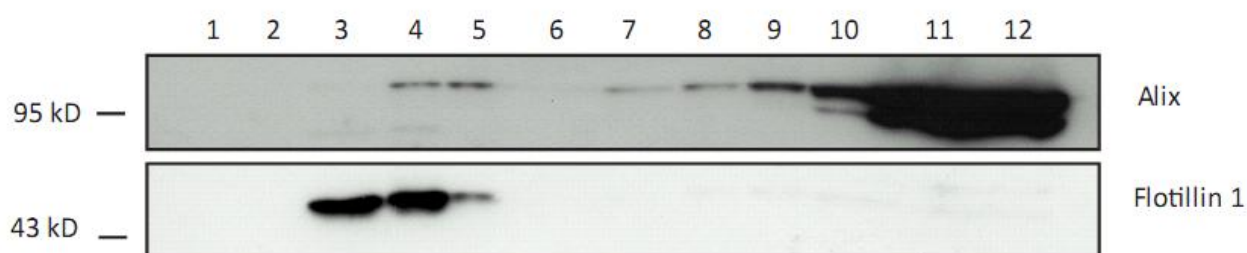


Figure 42: La protéine Alix est présente dans les DRM

Les DRM des MEF wt ont été séparés sur gradient de sucrose selon le protocole décrit par Ludwig et al., 2010. Brièvement, les MEF ont été trypsinisées, centrifugées et resuspendues dans un tampon 1%Triton/TNE (50mM Tris, pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, plus protease inhibitor cocktail; Roche). Le lysat a été ajusté à 40% de sucrose et placé au fond d'un tube d'ultracentrifugation. 6 ml de sucrose à 35% et 2 ml de sucrose à 8% ont été ajoutés puis le tube a été centrifugé à 35000 rpm pendant 16 heures. 12 fractions de 1ml ont été collectées en haut du gradient et les protéines de chaque fraction ont été précipitées via un protocole TCA/DOC avant d'être analysées par western-blot.

2.5 GPI-GFP est moins mobile, sous la membrane plasmique, dans les MEF ko Alix

Au cours de mon travail, nous avons montré que l'internalisation de GPI-GFP, un marqueur de la CIE, est fortement inhibée dans les cellules ko Alix (article Figure 3). Nous avons également utilisé des expériences de FRAP afin de caractériser la dynamique, et de ce fait l'internalisation du GPI-GFP sous la membrane plasmique. Afin de nous affranchir du transport antérograde du GPI-GFP, les cellules ont été traitées à la cycloheximide (inhibiteur de la traduction protéique) 5 heures avant l'expérience de FRAP. Les résultats obtenus montrent que la mobilité de GPI-GFP sous la membrane plasmique est affectée dans les MEF ko Alix et que la fraction immobile est significativement augmentée (~20%) dans ces cellules (Figure 43). Ces modifications renforcent nos résultats montrant que l'endocytose du GPI-GFP est inhibée dans les MEF ko Alix, même si nous ne pouvons pas exclure de cette expérience, un problème de recyclage de la protéine.

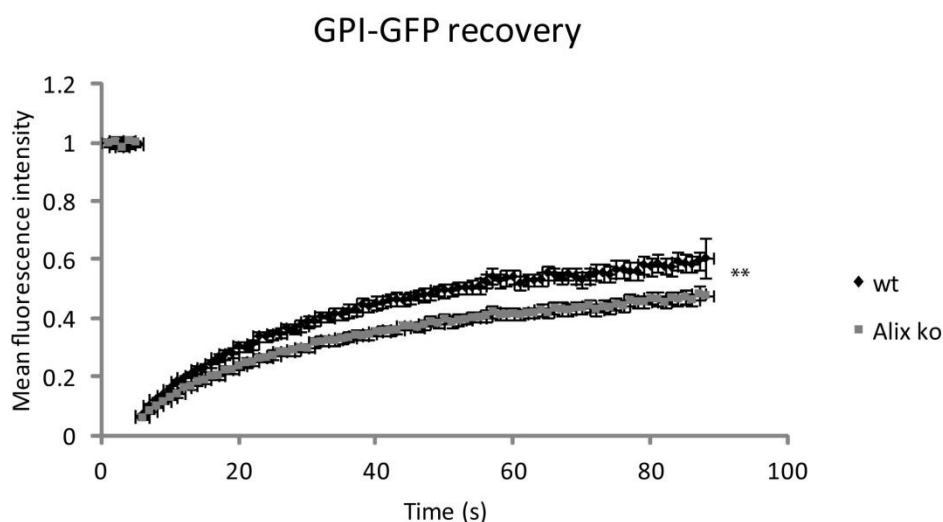


Figure 43: La mobilité du GPI-GFP sous la membrane plasmique est affectée dans les MEF ko Alix.

Les MEF wt et ko Alix transfectées 16 heures avec la GPI-GFP ont été traitées 5 heures à la cycloheximide et des expériences de FRAP sous la membrane plasmique ont été réalisées. Le retour de fluorescence dans ces zones a été analysé sur 20 cellules pour chaque phénotype. n=3 ; 30 cellules ; **p<0.02

2.6 Effet de différents mutants d'Alix sur l'internalisation de la CTxB

Nous avons montré que la CIE de la CTxB est fortement inhibée dans les MEF ko Alix et qu'il est possible de restaurer l'internalisation de la toxine en infectant des MEF ko Alix avec un virus codant pour la protéine Alix sauvage (article Figure 6). Afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire par lequel Alix contrôle l'internalisation de la CTxB, nous avons

également infecté des MEF ko Alix avec différents mutants d'interaction de la protéine Alix. Comme nous l'avons déjà vu, un mutant d'Alix délété de son site d'interaction avec les endophilines (Alix Δ endophilin) ne restaure pas l'endocytose de la CTxB (article Figure 6), suggérant que la fonction d'Alix dans la CIE de la CTxB est dépendante des endophilines.

La plupart des fonctions d'Alix à la membrane plasmique ont été décrites comme dépendantes de l'interaction d'Alix avec les protéines ESCRT (bourgeonnement des virus, réparation membranaire, cytokinèse). Afin de savoir si la fonction d'Alix dans l'endocytose de CTxB est dépendante de sa capacité à lier les ESCRT, nous avons exprimé des mutants d'Alix ne pouvant pas lier CHMP4 (ESCRT III) ou Tsg101 (ESCRT I) et analysé l'internalisation de la CTxB dans ces cellules. Les résultats que nous avons obtenus (Figure) montrent que l'expression d'Alix Δ Tsg101 restaure l'internalisation de la CTxB de façon comparable à Alix sauvage suggérant que cette interaction n'est pas requise pour la fonction d'Alix dans ce processus. En ce qui concerne le mutant d'Alix délété de son site d'interaction avec CHMP4 (Alix Δ CHMP4), il ne restaure que partiellement l'endocytose de la CTxB, suggérant un rôle de cette interaction dans la fonction d'Alix dans l'internalisation de la CTxB.

Dans le cadre de la réparation de la membrane plasmique, il a été montré qu'Alg-2 permet de recruter Alix à la membrane plasmique de façon calcium dépendante (Scheffer et al., 2014). Une autre étude a montré que le site d'interaction d'Alix avec le LBPA semble important pour la localisation d'Alix au site de la blessure (Jimenez et al., 2014). De plus, la protéine Alix est capable de lier le calcium via un acide aspartique en position 178 et cette interaction semble nécessaire pour qu'Alix puisse lier le LBPA à la membrane de l'endosome (Bissig et al., 2013). Nous avons donc exprimé des mutants d'Alix ne pouvant pas lier Alg-2 (Alix Δ Alg-2), le LBPA (Alix Δ LBPA) ou le calcium (Alix Δ Ca²⁺) afin d'analyser l'importance de ces interactions pour la fonction d'Alix dans l'internalisation de la CTxB. Les résultats que nous avons obtenus (Figure) montrent que ces trois mutants ne restaurent que partiellement l'internalisation de la CTxB, ce qui suggère un rôle de ces interactions dans ce processus.

Alix est aussi capable de lier, dans son domaine PRD, CIN85 et cette interaction semble impliquée dans l'endocytose de l'EGFR (Schmidt et al., 2004). De plus, CIN85 a récemment été impliquée dans la voie FEME (Boucrot et al., 2014). Nous avons donc exprimé des mutants d'Alix délétés du domaine PRD (Alix Δ PRD, domaine impliqué dans l'interaction d'Alix avec plusieurs partenaires, dont les endophilines A et CIN85) ou du site d'interaction avec CIN85 (Alix Δ CIN85) afin de caractériser leur rôle dans la CIE de la CTxB. Les résultats obtenus (Figure) montrent que l'expression d'Alix Δ CIN85 et d'Alix Δ PRD ne restaurent pas l'internalisation de la CTxB (Figure 44), ce qui amène à penser que l'interaction d'Alix avec

CIN85 est importante pour contrôler l'endocytose de la CTxB. Ce résultat est en accord avec ceux de Boucrot et al, qui impliquent CIN85 avec les endophilines, dans la voie FEME (Boucrot et al., 2014).

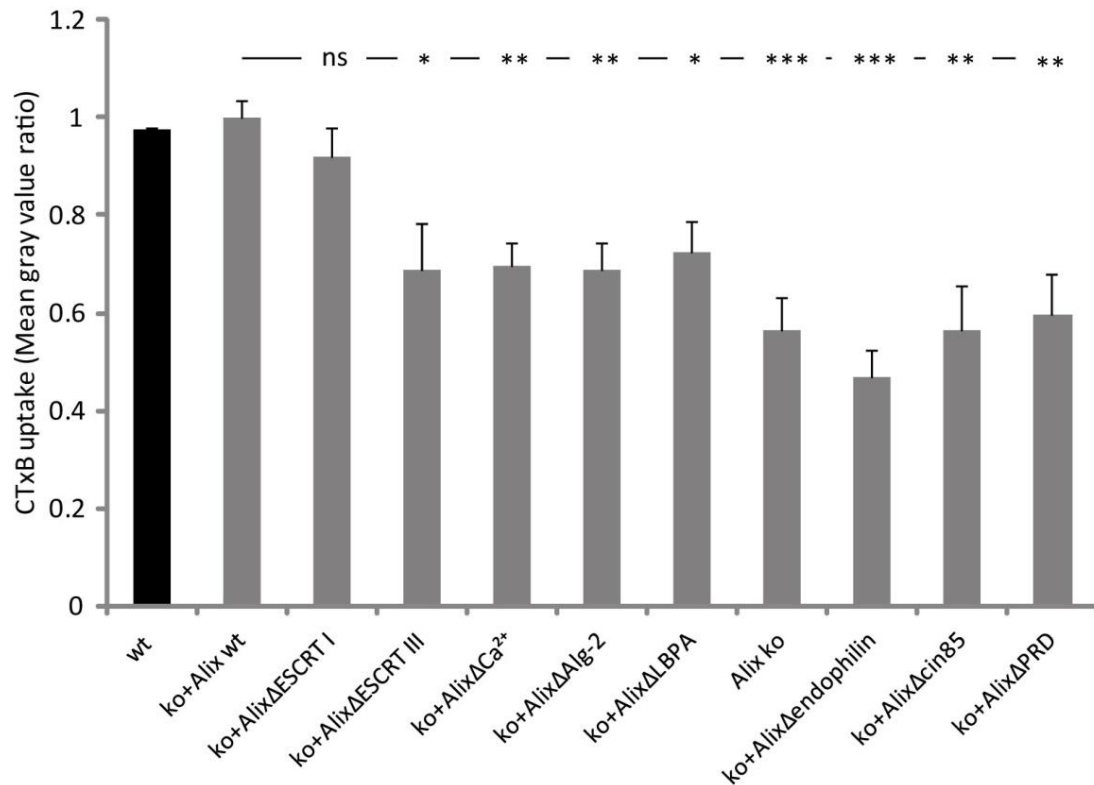


Figure 44: Effet des différents mutants d'Alix sur l'internalisation de la CTxB

Les MEF ko Alix ont été infectées avec un virus codant pour différentes constructions d'Alix et l'internalisation de la CTxB (5 minutes à 37°C) a été quantifiée via imageJ dans les cellules exprimant ces constructions. n=4, 120 cellules *p<0.05 ; **p<0.02 ; ***p<0.001

2.7 Rôle des partenaires ESCRT d'Alix dans la CIE de la CTxB

Comme nous venons de le voir, l'interaction d'Alix avec Tsg101 (ESCRT I) ne semble pas requise pour la fonction d'Alix dans la CIE de la CTxB. En ce qui concerne l'interaction d'Alix avec CHMP4 (ESCRT III), le résultat est ambigu puisque nous avons observé une restauration partielle de l'internalisation de la CTxB. Afin de statuer sur la fonction des protéines ESCRT (plus particulièrement ESCRT III, CHMP4) dans la CIE, nous avons étudié en microscopie, la colocalisation éventuelle des ESCRT, ainsi que des mutants d'Alix délétés des sites d'interaction avec ESCRT I (Tsg101) ou avec ESCRT III (CHMP4), avec les patches formés par la CTxB à 4°C.

Pour cela, nous avons dans un premier temps transfecté des MEF wt avec la construction GFP-CHMP4 ou la construction GFP-Tsg101 que nous avons ensuite incubées à 4°C avec la CTxB. Les résultats obtenus (Figure 45) révèlent que ni CHMP4 ni Tsg101 ne sont recrutées aux patchs CTxB lors de l'ajout de la toxine. Nous avons également transfecté des MEF ko Alix avec le mutant d'Alix délété de son site d'interaction avec CHMP4 (AlixΔCHMP4) ou le mutant d'Alix délété de son site d'interaction avec Tsg101 (AlixΔTsg101) et incubé ces cellules avec la CTxB à 4°C. Nous avons observé qu'AlixΔCHMP4 et AlixΔTsg101 sont recrutées normalement aux patchs de CTxB de façon comparable à Alix wt (Figure 45). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que la fonction d'Alix dans l'internalisation de la CTxB est indépendante de l'interaction d'Alix avec ses partenaires ESCRT.

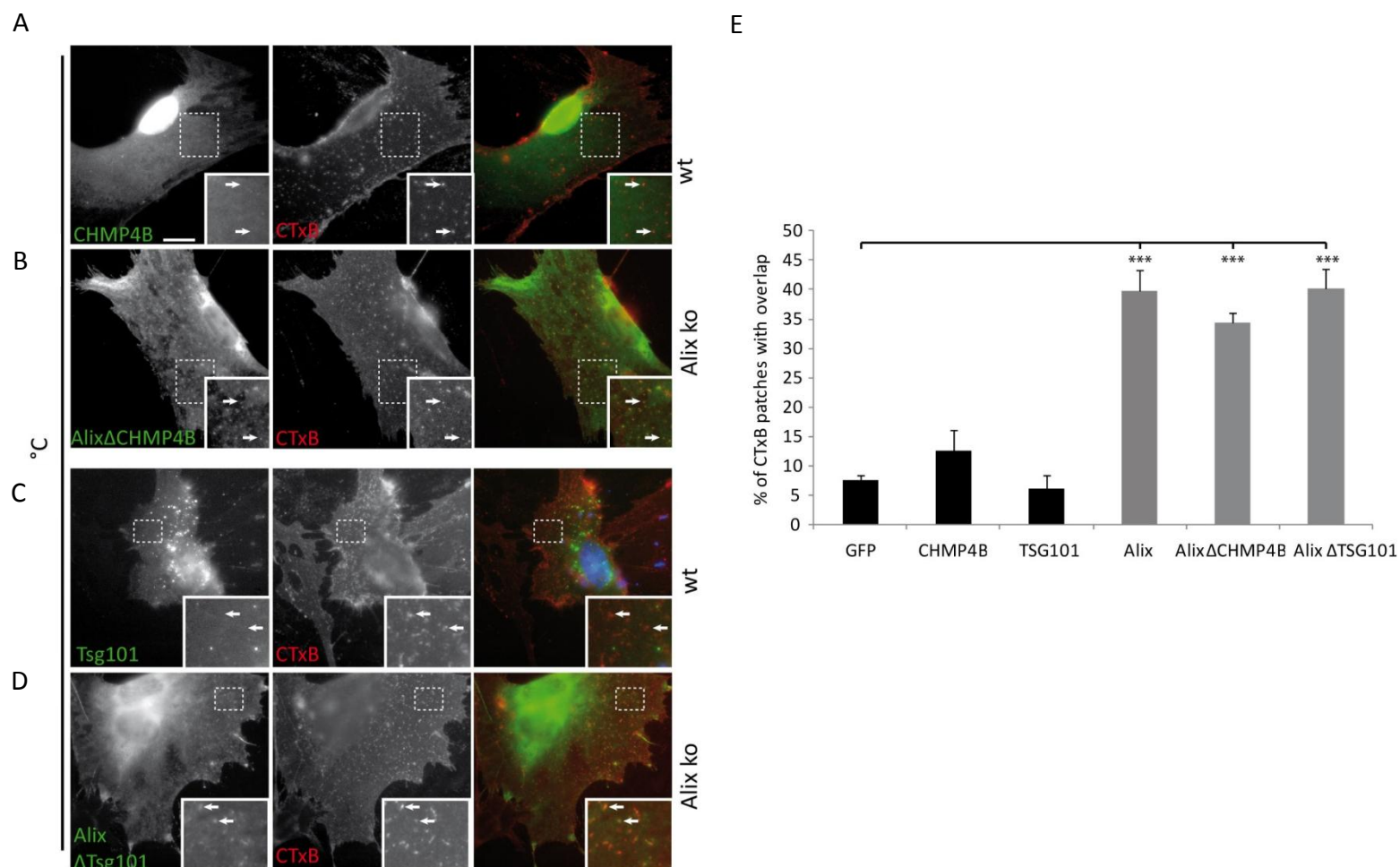


Figure 45: CHMP4 et Tsg101 ne sont pas recrutés aux zones de la membrane enrichies en CTxB à 4°C et l'interaction d'Alix avec ces protéines n'est pas nécessaire pour le recrutement d'Alix aux patchs de CTxB

A,C) MEF transfectées avec GFP-CHMP4 (A) ou GFP-Tsg101 (C) pendant 12 heures et incubées 20 minutes à 4°C avec la CTxB-TRITC.

B,D) MEF ko Alix transfectées 24 heures avec AlixΔCHMP4-Flag (B) ou AlixΔTsg101-Flag (D) et incubées 20 minutes à 4°C avec la CTxB-TRITC.

F) Quantification, via ImageJ, du nombre de patchs de CTxB qui concentrent les différentes protéines transfectées. n=3, 60 cellules, p***<0.001

Parallèlement à ces expériences, nous avons analysé l'effet de la déplétion de CHMP4 sur l'internalisation de la CTxB dans les MEF wt et ko Alix. Pour ce faire, nous avons transfecté les MEF wt et ko Alix avec un shContrôle (scl) ou un shCHMP4-GFP (shCHMP4) pendant 72 heures et avons analysé l'internalisation de la CTxB après 5 minutes à 37°C (Figure 46). Les résultats que nous avons obtenus montrent que la déplétion de CHMP4 n'a pas d'effet sur l'internalisation de la CTxB dans les cellules wt. Par contre, de façon surprenante, la déplétion de CHMP4 semble restaurer l'internalisation de la CTxB dans les cellules ko Alix, suggérant que CHMP4 agit comme un inhibiteur de l'internalisation de la CTxB en absence de la protéine Alix. Une étude plus poussée du rôle de CHMP4 dans l'internalisation de la CTxB devra être menée afin de pouvoir conclure sur le rôle de cette protéine dans ce processus.

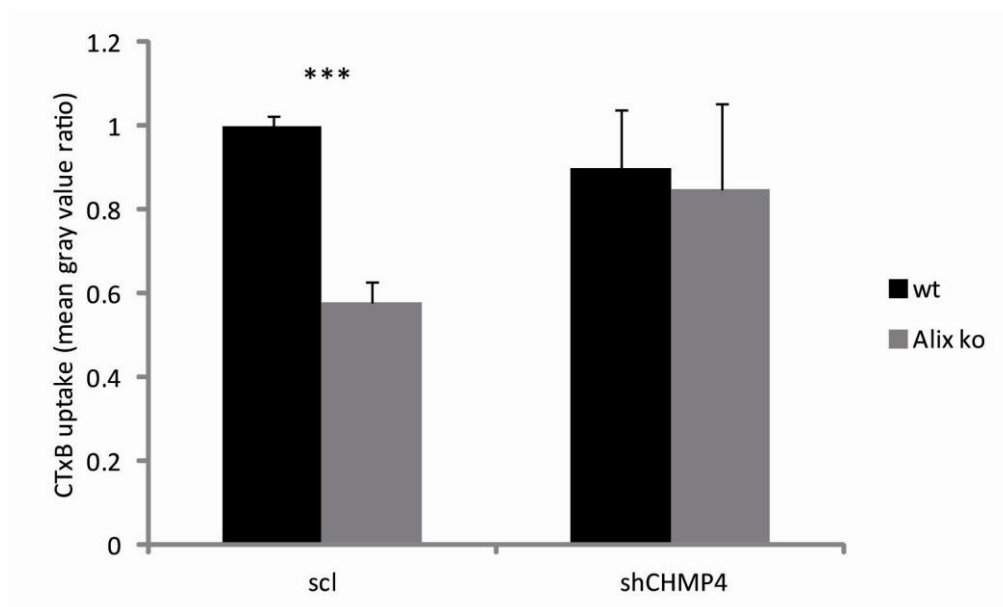


Figure 46: Effet de la depletion de CHMP4B sur l'internalisation de la CTxB

Les cellules wt ou ko Alix ont été transfectées 72 heures avec un shContrôle (scl) couplé à la GFP ou avec un shCHMP4 couplé à la GFP. Les cellules ont été incubées en présence de CTxB-TRITC pendant 20 minutes à 4°C, rincées puis placées 5 minutes à 37°C afin d'induire l'internalisation de la toxine. La valeur moyenne de fluorescence de la CTxB par cellule transfectée a été mesurée via ImageJ. n=2, 40 cellules, p***<0.001

Discussion

Alix est une protéine cytoplasmique, adaptatrice, qui a été impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que l'endocytose, l'apoptose, la cytokinèse, la réparation membranaire ou encore le bourgeonnement des virus à la membrane plasmique (Sadoul et al., 2006, Jimenez et al., 2014). La plupart des interacteurs connus d'Alix sont des protéines impliquées dans l'endocytose. Parmi ces partenaires, Alix interagit notamment avec les complexes ESCRT-I et ESCRT-III, et le LBPA ce qui suppose un rôle d'Alix dans la formation des ILV (Strack et al., 2003 ; Katoh et al., 2003 ; Bissig et al., 2004). Cependant, chez les mammifères, la déplétion d'Alix n'a pas d'effet majeur sur la dégradation de l'EGFR (Cabezas et al., 2005; Chevallier et al., 2008). Plus récemment, une fonction d'Alix dans le processus de back fusion, a été proposée (Bissig et al., 2013). La back fusion permet à une ILV déjà formée de fusionner avec la membrane limitante de l'endosome afin d'expulser du matériel ne devant pas être dégradé. Alix pourrait, lorsqu'elle se lie au LBPA, insérer une boucle hydrophobe dans la membrane endosomale et ainsi faciliter la fusion de l'ILV avec la membrane limitante de l'endosome (Bissig et al., 2013).

Dans cette étude, nous avons utilisé des MEF ko Alix afin de clarifier la fonction cellulaire de la protéine Alix et plus particulièrement sa fonction dans la voie endolysosomale. Pour ce faire, nous avons analysé la morphologie des compartiments de la voie endocytaire dans les cellules ko Alix. Nous avons également réalisé des tests fonctionnels afin d'analyser l'état de la voie endocytaire dans ces cellules. De façon surprenante, il est apparu au cours de ce travail que les endosomes et en particulier les MVB sont normaux dans les MEF ko Alix et que le trafic endosomal n'est pas altéré. De plus, nous montrons pour la première fois, un effet significatif de la déplétion d'Alix sur la dégradation de l'EGFR. Cependant, il est apparu que, c'est l'étape d'internalisation, à la membrane plasmique qui est affectée par l'absence d'Alix, plutôt que le tri du récepteur au niveau du MVB. Nous avons également constaté que la CIE est spécifiquement affectée par l'absence d'Alix alors que la CME demeure intacte dans les MEF ko Alix. De plus, la protéine Alix ne semble pas impliquée dans une voie CIE particulière puisque l'endocytose de cargos connus pour emprunter des CIE différentes est inhibée dans les MEF ko Alix. Ainsi, nous avons montré que l'internalisation de la phase fluide, du GPI-GFP, de l'intégrine $\beta 1$, de l'EGF à forte concentration et de la CTxB est affectée par la déplétion d'Alix. Par contre, l'endocytose du récepteur à la transferrine ainsi que celle de l'EGFR à faible concentration semblent normales dans les cellules ko Alix. Les résultats que nous avons obtenus montrent de plus que cette fonction d'Alix dans la CIE est dépendante de sa capacité à lier les endophilines A. Nous avons également observé qu'Alix ainsi que l'endophiline A2 peuvent être recrutées au niveau de régions de la membrane

plasmique qui concentrent la CTxB (patch), un marqueur de la CIE. Parallèlement à notre travail impliquant Alix et l'endophiline A2 dans la CIE sortaient deux études impliquant les endophilines dans une nouvelle CIE empruntée notamment par l'EGFR à forte concentration et la CTxB. L'inhibition de la CIE dans les MEF ko Alix a également été associée à des effets physiologiques. Ainsi, nos résultats démontrent que la migration, l'étalement cellulaire et la signalisation de l'IL2R, trois processus connus pour être régulés par la CIE, sont altérés dans les MEF ko Alix.

Dans cette partie, nous allons discuter, dans un premier temps, de l'effet de l'absence d'Alix sur la dégradation du récepteur à l'EGF et la formation des ILV. Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à l'inhibition spécifique de la CIE dans les MEF ko Alix, ainsi qu'au rôle moléculaire que pourrait jouer la protéine Alix et le couple Alix/endophiline dans la CIE. Nous discuterons également de la présence d'Alix à la membrane plasmique et la façon dont elle pourrait y être recrutée. Nous nous intéresserons enfin aux effets physiologiques associés à l'inhibition de la CIE dans les MEF ko Alix et nous finirons par une conclusion générale de l'ensemble de ce travail de thèse.

1. La déplétion d'Alix ralentit la dégradation de l'EGFR sans altérer de façon majeure le trafic endosomal ou la formation des ILV

Dans cette étude, nous montrons que la dégradation de l'EGFR est retardée dans les MEF ko Alix. L'analyse de la dégradation de l'EGFR suite à la stimulation par l'EGF est un test couramment utilisé dans le domaine de l'endocytose. Ce test permet notamment de voir si le tri du récepteur vers la voie de dégradation se fait convenablement. Comme je l'ai déjà mentionné, au vu de ses interactions avec les complexes ESCRT I et ESCRT III, un rôle d'Alix dans le tri des récepteurs avait été envisagé chez les mammifères, suite à la fonction décrite pour son homologue Bro1 chez la levure. Ainsi, plusieurs équipes de recherche ont analysé la dégradation de l'EGFR dans des cellules déplétées en Alix par des siRNA et ont montré que la déplétion d'Alix n'a pas d'effet majeur sur la dégradation de l'EGFR (Schmidt et al., 2005, Cabezas et al., 2005, Bowers et al., 2006 ; Luyet et al., 2008). Il semble donc que, dans les cellules de mammifères, la protéine Alix ne soit pas indispensable pour le tri de l'EGFR au niveau des ILV. Il a été proposé que HDPTP, un homologue d'Alix pourrait remplir la fonction de Bro1 chez les mammifères puisque sa déplétion affecte fortement la dégradation de l'EGFR et la formation des ILV (Doyotte et al., 2008). Comme je l'ai déjà mentionné, au cours de mon travail de thèse, nous avons observé un retard de la dégradation

de l'EGFR dans les MEF ko Alix, ce qui est compatible avec un rôle d'Alix dans la formation des ILV. En effet, nous avons réalisé une cinétique de dégradation de l'EGFR et avons constaté que le récepteur est bel et bien dégradé dans les MEF ko Alix, mais plus lentement que dans les cellules wt. Notre interprétation est que, ce ralentissement de la dégradation de l'EGFR, est dû à une inhibition de son internalisation plutôt qu'à un défaut de tri au niveau du MVB. Cette hypothèse est fondée sur le fait que l'internalisation de l'EGFR à forte concentration est inhibée en absence d'Alix et que la caractérisation morphologique des compartiments de la voie endocytaire, en particulier des MVB, n'a pas permis de mettre en évidence d'anomalies majeures dans les MEF ko Alix. De plus, en suivant le trafic de la BSA-gold le long des compartiments endocytaires, nous avons mis en évidence que le trafic n'est pas bloqué, mais simplement décalé dans le temps, du fait d'un défaut d'internalisation.

Le résultat que nous avons obtenu sur l'effet de l'absence d'Alix sur la dégradation de l'EGFR est en désaccord avec les études précédentes (Cabezas et al., 2005 ; Luyet et al., 2008 ; Doyotte et al., 2008). Cette différence pourrait être due au fait que les expériences antérieures ont été réalisées dans des lignées cellulaires de type HeLa (Cabezas et al., 2005 ; Luyet et al., 2008) dans lesquelles la cinétique de dégradation n'est peut-être pas identique à celle observée dans des cellules primaires. La majorité de ces tests de dégradation de l'EGFR ont été réalisés sur des temps longs de stimulation à l'EGF, typiquement de l'ordre de 6 heures (Cabezas et al., 2005 ; Luyet et al., 2008). Nous montrons que la dégradation de l'EGFR n'est pas bloquée par l'absence d'Alix, de ce fait il est envisageable qu'un effet de la déplétion d'Alix sur la dégradation de l'EGFR dans des cellules de type HeLa ait pu être observé sur des temps plus courts de stimulation à l'EGF. De plus, nous ne pouvons pas exclure le fait qu'un modèle de cellules ko ne soit pas identique à un modèle utilisant des siRNA. En effet, dans les MEF ko Alix, la déplétion de la protéine Alix est totale alors qu'elle ne l'est pas dans des cellules traitées par siRNA. Même si le niveau d'expression d'Alix après traitement des cellules par siRNA est très faible, il est peut être toujours suffisant pour assurer certaines fonctions de la protéine.

En accord avec nos résultats, une étude récente a démontré que la dégradation de l'EGFR est ralentie par la déplétion d'Alix (Sun et al., 2014). Il a été montré dans ce travail que la stimulation, de l'EGFR par l'EGF, induit l'interaction d'Alix, au niveau de son v-domaine, avec le récepteur ubiquitiné, la dimérisation d'Alix et l'augmentation de l'interaction d'Alix avec CHMP4 au niveau de l'endosome. L'inhibition, de l'interaction d'Alix avec CHMP4, de la dimérisation d'Alix ou l'extinction d'Alix par des siRNA ralentissent la dégradation de l'EGFR et prolongent sa signalisation (Sun et al., 2014). Pour les auteurs de cette étude,

l'effet de la déplétion d'Alix serait donc lié à un déficit de formation des ILV. Cependant, dans ce travail, il n'y a pas d'observation en microscopie électronique permettant de valider cette hypothèse. De plus, les auteurs n'ont pas vérifié l'internalisation de l'EGFR dans leurs cellules déplétées en protéine Alix.

Il est important de noter que dans cette étude, les auteurs ont utilisé deux protocoles différents pour analyser l'effet de la déplétion d'Alix sur la dégradation de l'EGFR. En effet, ils ont soit réalisé une stimulation continue à l'EGF (le protocole que nous avons utilisé), soit un pulse-chase à l'EGF. De façon intéressante, l'effet de la déplétion d'Alix sur la dégradation de l'EGFR est beaucoup plus marqué lors de la stimulation continue à l'EGF alors qu'il n'est visible que pendant la première heure lors de l'expérience de pulse-chase (Sun et al., 2014). Ce résultat pourrait expliquer le fait qu'aucun effet de la déplétion d'Alix n'ait été observé sur la dégradation de l'EGFR dans les études antérieures, puisque la plupart ont utilisé le protocole de pulse-chase à l'EGF (Cabezas et al., 2005 ; Doyotte et al., 2008 ; Luyet et al., 2008).

Il a été proposé que la protéine Alix régule la formation des ILV chez les mammifères, via son interaction avec le LBPA (Matsuo et al., 2004). De plus, la déplétion d'Alix, par des siRNA, dans des cellules BHK, entraîne une diminution du LBPA à la membrane de l'endosome ainsi que l'apparition de MVB dépourvues d'ILV (Chevalier et al., 2008). Lors de notre caractérisation des MEF ko Alix, nous n'avons pas constaté d'anomalies majeures de la morphologie des MVB. En effet, notre étude en microscopie électronique a montré que la morphologie des MVB des MEF ko Alix semble normale, puisque les MVB contiennent des ILV et présentent une taille comparable au MVB des cellules wt. De plus, le cholestérol comme le LBPA, présentent la même distribution et intensité de marquage en microscopie de fluorescence dans les cellules wt et les cellules ko Alix.

Cependant, il est important de noter que nous avons constaté une diminution de 20% du nombre d'ILV par MVB dans les cellules ko Alix par rapport aux cellules contrôles. Cette différence pourrait être compatible avec le retard de la dégradation de l'EGFR que nous avons observé dans notre étude et de ce fait, à un rôle d'Alix dans la formation des ILV. Cependant, l'effet que nous observons sur la dégradation de l'EGFR est, selon notre hypothèse, lié à l'inhibition de l'internalisation de l'EGFR. De plus, cette légère diminution du nombre d'ILV par MVB est compatible avec un rôle d'Alix dans le phénomène de back fusion, comme il a récemment été proposé (Bissig et al., 2013). En effet, de façon intéressante, Alix et le LBPA sont impliqués dans la back fusion, qui signifie que l'ILV après avoir été formé va pouvoir fusionner avec la membrane de l'endosome et libérer son contenu dans le cytoplasme. Ce

processus est utilisé par certain virus pour éviter l'environnement acide du MVB (Abrami et al., 2004 ; Leblanc et al., 2005 ; Abrami et al., 2013 ; Bissig et al., 2013). La liaison d'Alix avec le LBPA à la membrane de l'endosome induirait un changement de conformation d'Alix, lui permettant d'insérer une boucle hydrophobe dans la membrane. Cette insertion d'Alix aurait pour effet de décaler les glycoprotéines enchassées dans la membrane endosomale et ainsi créer une portion de membrane libre permettant la fusion de l'ILV avec la membrane endosomale (Bissig et al., 2013). Il est probable que la déplétion d'Alix affecte ce processus de back fusion et impacte donc le nombre d'ILV par MVB. Toutefois, la baisse du nombre d'ILV par MVB dans les MEF ko Alix pourrait aussi être le reflet de l'inhibition de l'internalisation de l'EGFR puisqu'il est connu que l'EGF peut stimuler la formation des ILV (Futter et al., 1996).

2. La CIE est spécifiquement inhibée dans les MEF ko Alix alors que la CME est intacte

La quantification de l'internalisation de plusieurs cargos entrants par CIE, nous a permis de mettre en évidence l'importance de la protéine Alix dans cette voie d'endocytose. Ainsi, l'endocytose, de la phase fluide, de l'EGF à forte concentration, de la CTxB, de l'intégrine $\beta 1$ ou encore du GPI-GFP est affectée par l'absence d'Alix. D'autre part, l'internalisation de la transferrine, de l'EGF à faible concentration n'est pas impactée par la déplétion d'Alix. Le fait que l'endocytose de l'EGF ne soit inhibée qu'en présence de fortes concentrations d'EGF nous a conforté dans la spécificité d'un rôle d'Alix dans la CIE, puisqu'il est maintenant admis qu'à de telles concentrations, l'EGF emprunte à la fois la CME et la CIE alors que seule la CME est utilisée à faible concentration d'EGF (Sigismund et al., 2005 ; Sigismund et al., 2008). De plus, nous avons montré que la composante CME de la CTxB n'est pas affectée dans les MEF ko Alix. Nous avons en effet montré que le traitement de cellules ko Alix avec de la filipine, un inhibiteur de la CIE, n'affecte pas l'internalisation de la CTxB alors qu'un traitement avec de la chlorpromazine, un inhibiteur de la CME, l'affecte significativement, confortant l'implication spécifique d'Alix dans la CIE de la CTxB. Toutefois, il est important de noter qu'il a été récemment montré, de façon surprenante, que la chlorpromazine pourrait être un inhibiteur de la CIE (Boucrot et al., 2014). Il faudrait donc, nous assurer qu'Alix n'est pas impliquée dans la CME de la CTxB, en analysant l'internalisation de la CTxB dans les MEF ko Alix traitées par des siRNA ou des shRNA dirigés contre la clathrine.

3. Alix et ses partenaires dans la CIE

3.1 Alix/CIN85

Un rôle d'Alix dans l'internalisation de l'EGFR a déjà été suggéré, bien que démontrant un effet inverse à nos résultats. En effet, Schmidt et al, ont observé que l'inhibition de l'expression d'Alix par des siRNA, induit une augmentation de l'internalisation de l'EGFR à forte concentration (50 ng/ml) (Schmidt et al., 2004). D'un autre côté, la surexpression d'Alix est associée à une inhibition de cette internalisation. Il est important de noter que la majorité des expériences réalisées dans cette étude ont été faites sur des cellules de lignée surexprimant l'EGFR, ce qui peut modifier son comportement. L'interprétation de Schmidt et al, est qu'Alix surexprimée bloque l'interaction de Cbl avec CIN85 en séquestrant le couple CIN85-endophiline empêchant de ce fait leur interaction avec Cbl. Il a récemment été montré que ces protéines ; CIN85, Cbl et les endophilines, sont impliquées dans la voie FEME (CIE dépendante des endophilines) qui prend notamment en charge l'EGFR à forte concentration (Boucrot et al., 2014). De plus, lors de nos expériences de restauration de l'internalisation de la CTxB dans les MEF ko Alix, nous avons observé que le mutant d'Alix ne pouvant lier CIN85 (Alix Δ CIN85) ne restaure pas l'internalisation de la toxine. Il semble donc que l'interaction d'Alix avec CIN85 est effectivement impliquée dans l'internalisation et plus spécifiquement dans la CIE. Cependant, afin de confirmer le rôle spécifique de l'interaction d'Alix avec CIN85 dans la CIE, il faudrait analyser l'endocytose de la transferrine dans les MEF ko qui expriment Alix Δ CIN85 ainsi que l'endocytose de la CTxB et de l'EGF à faible et forte concentration dans des MEF wt déplétées en protéine CIN85. Il serait également intéressant de voir si CIN85 est recrutée, comme Alix et les endophilines, aux patchs de CTxB à 4°C, à la membrane plasmique.

3.2 Alix/endophilines

Nos données montrent que l'implication d'Alix dans la CIE est dépendante de sa capacité à lier les endophilines, au moins en ce qui concerne la CIE de la CTxB. Deux études récentes ont également impliqué les endophilines dans la CIE de la CTxB ainsi que dans la CIE de l'EGFR (Boucrot et al., 2014 ; Renard et al., 2014). Il est donc envisageable que l'implication d'Alix dans la CIE de l'EGFR requiert également sa liaison aux endophilines. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer l'internalisation de l'EGFR dans les MEF ko Alix exprimant un mutant d'Alix délété de son site d'interaction avec les endophilines (Alix Δ endophiline). Il serait également intéressant de voir si Alix est recrutée, comme les endophilines (Boucrot et al., 2014), au bord de la cellules après stimulation à forte concentration d'EGF, comme nous l'avons observé lors de l'étude de la CTxB. De plus, il

faudrait que nous analysions l'internalisation d'autres cargos (GPI-GFP, EGFR à forte concentration...) dans ces MEF qui expriment Alix Δ endophilin, d'autant plus que les GPI-AP n'ont pas été décrits comme empruntant la voie FEME (Boucrot et al., 2014). Enfin, il serait intéressant de vérifier que les autres cargos induisent le recrutement d'Alix et des endophilines à la membrane plasmique, comme nous l'avons montré pour la CTxB.

3.3 Alix/Galectin 3

Alix interagit également avec la Galectin-3 (Chen et al., 2009), une protéine proposée pour jouer un rôle dans l'endocytose de récepteurs décrits pour entrer par la voie CG (Lakshminarayan et al., 2014) ainsi que dans l'endocytose de l'EGFR (Liu et al., 2012). Il a été décrit que l'endocytose et le recyclage de l'EGFR semblent en effet affectés dans des cellules KO pour la Galectine-3 (Liu et al., 2012). Dans cette étude, l'inhibition de l'internalisation de l'EGFR semble être corrélée à une diminution de l'association d'Alix avec l'EGFR. Il serait intéressant d'analyser l'importance de l'interaction d'Alix avec la Galectine-3 dans notre modèle. Cependant, le site d'interaction d'Alix avec la Galectine-3 n'est pas connu à l'heure actuelle.

3.4 Alix/ESCRT

La plupart des fonctions cellulaires dans lesquelles sont impliquées Alix dépendent de la capacité d'Alix à lier les protéines ESCRT (bourgeonnement des virus, cytokinèse, réparation membranaire...)(Zhou et al., 2010 ; Morita et al., 2007 ; Jimenez et al., 2014). Nous avons donc pensé à un rôle des protéines ESCRT dans la CIE dépendante d'Alix. En effet, Alix pourrait être nécessaire au recrutement des ESCRT à la membrane plasmique et permettre aux ESCRT de polymériser et de former des protrusions membranaires de part et d'autre du site d'entrée de la toxine. Ce phénomène pourrait ainsi faciliter l'internalisation de CTxB notamment en induisant une augmentation de la tension locale de la membrane plasmique qui faciliterait la fission. Cependant, nous avons montré que Tsg101 n'est pas requis dans l'endocytose de la CTxB puisque l'expression du mutant d'interaction d'Alix avec Tsg101 (Alix Δ Tsg101) restaure complètement l'endocytose de CTxB dans les MEF ko Alix. De plus, Tsg101 n'est pas recrutée au site d'entrée de la CTxB. Par contre, les résultats que nous avons obtenus concernant le rôle de CHMP4 dans l'internalisation de la CTxB sont moins clairs que ceux obtenus pour Tsg101. En effet, CHMP4 ne semble pas être recrutée aux patches de la CTxB, pourtant le mutant d'interaction d'Alix avec CHMP4 (Alix Δ CHMP4) ne restaure pas complètement l'endocytose de la CTxB. Pour être sur de pouvoir exclure ESCRT III de ce

mécanisme, nous avons déplété les MEF wt et ko Alix en CHMP4 avec un sh dirigé contre cette protéine. Là encore les résultats ne sont pas simples à interpréter, puisque la déplétion de CHMP4 dans les cellules wt n'a aucun effet sur l'endocytose de la CTxB (suggérant que CHMP4 n'est pas impliqué) alors que sa déplétion dans les MEF ko Alix a tendance à restaurer l'internalisation de la toxine. Une étude plus poussée du rôle de CHMP4 dans l'internalisation de la CTxB est donc nécessaire afin de pouvoir statuer sur le rôle de cette protéine dans ce processus.

3.5 Alix/actine

La protéine Alix a été impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine, du fait de son interaction avec l'actine et des protéines qui régulent sa polymérisation (cortactine, FAK, Pyk2...) (Schmidt et al., 2003, 2005 ; Cabezas et al., 2005). La déplétion d'Alix inhibe la formation des fibres de stress (Pan et al., 2006) et conduit à l'accumulation de structures anormales enrichies en actine (Cabezas et al., 2005 ; Bongiovanni et al., 2012). Etant donnée l'importance du cytosquelette d'actine dans la CIE, l'inhibition de la CIE dans les MEF ko Alix pourrait résulter d'une dérégulation du cytosquelette d'actine. De plus, Alix interagit également avec CD2AP, un orthologue de CIN85, qui couple le cytosquelette d'actine à l'endocytose de certains récepteurs membranaires (Monzo et al., 2005). Cependant, nous n'avons pas observé de perturbation majeure du cytosquelette d'actine à l'état basal dans les MEF ko Alix. De plus, des marquages de l'actine dans les MEF wt et ko Alix après l'internalisation de la CTxB ne m'ont pas permis de mettre en évidence une distribution aberrante de l'actine en absence d'Alix. Afin de confirmer que l'effet de la déplétion d'Alix sur la CIE n'est pas dû à une perturbation du cytosquelette, il serait intéressant d'analyser l'effet d'un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (latrunculine) sur l'internalisation de la CTxB dans les MEF ko Alix.

4. Alix régule l'internalisation de la CTxB avec les endophilines

Comme je l'ai déjà évoqué, nous avons montré que le mutant d'Alix incapable de lier les endophilines (Alix Δ endophiline) ne restaure pas l'internalisation de la CTxB. De plus, Alix et l'endophiline A2 sont toutes deux recrutées aux patches de CTxB à la membrane plasmique, indépendamment l'une de l'autre. Pour la première fois, nous avons montré en biochimie qu'Alix est présente, sans stimulation, dans les DRM. De plus, nous avons montré par immunofluorescence qu'Alix est recrutée sur des DRM CTxB positives. Il serait intéressant

de voir en biochimie, si l'ajout de CTxB augmente l'association d'Alix aux DRM. Si tel est le cas, ce protocole pourrait nous permettre de tester facilement le recrutement des différents mutants d'Alix ainsi que des partenaires d'Alix aux DRM CTxB positifs. Nous pourrions également passer les fractions correspondantes aux DRM CTxB positifs sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille afin de voir si un complexe est présent et quelles protéines le composent.

Finalement, nous savons qu'Alix et les endophilines agissent de concert dans la CIE de la CTxB mais beaucoup de questions restent sans réponse. Notamment, comment Alix et les endophilines sont recrutées aux sites d'entrée de la toxine ? Quelle est leur fonction précise ?

En ce qui concerne les endophilines, des éléments de réponse ont été apportés récemment. En effet, il semblerait que les endophilines puissent être recrutées, via la lamellipodine, qui lie le PIP2 à la membrane plasmique (Boucrot et al., 2014). CIN85 et Cbl seraient impliquées dans la fonction des endophilines dans l'endocytose de l'EGFR (Boucrot et al., 2014). Les endophilines pourraient permettre la fission du tubule, dans le cas de la CTxB ou de la STxB, en parallèle de l'actine et de la dynamine (Renard et al., 2014).

Alix est un élément essentiel de cette voie médiée par les endophilines puisque nous montrons dans cette étude, que bien que les endophilines soient toujours recrutées aux patchs de CTxB dans les MEF ko Alix, elles ne peuvent remplir leur fonction lors de l'internalisation de la toxine. De plus, la déplétion de l'endophiline A2 dans les MEF ko Alix n'a aucun effet additif sur la CIE de la CTxB. L'hypothèse la plus simple est qu'Alix est nécessaire non pas au recrutement mais à l'organisation des endophilines en complexe protéique fonctionnel, assurant un rôle d'échafaudage au site d'entrée de la toxine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une étude en microscopie électronique (ME), de la distribution des endophilines au site d'entrée de la toxine dans les MEF wt et ko Alix. Cependant, l'anticorps dirigé contre les endophilines que nous possédons ne semble pas utilisable en ME. Pour contourner ce problème, cette expérience sera réalisée en exprimant une endophiline taggée. Il serait également intéressant d'analyser en microscopie électronique, la distribution d'Alix et des partenaires d'Alix et des endophilines impliqués dans cette CIE, tels que CIN85 et Cbl.

Nos expériences de recrutement d'Alix et des endophilines aux patchs de la CTxB ont été réalisées à 4°C, température à laquelle le système est figé. Ce test ne nous a pas permis de conclure quant à la cinétique de recrutement des protéines aux patchs formés par la CTxB. Il est donc envisageable que la protéine Alix puisse augmenter la vitesse de recrutement des endophilines au site d'entrée de la toxine, ce qui expliquerait l'importance d'Alix dans la CIE dépendante des endophilines. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser

une étude en vidéomicroscopie du recrutement des endophilines à la membrane plasmique lors d'ajout de la CTxB à 37°C dans les MEF wt et ko Alix. Enfin, plus généralement, une étude, en vidéomicroscopie, de la cinétique de recrutement des protéines (Alix, endophilines, CIN85) à la membrane plasmique, après ajout de la toxine, permettrait de caractériser l'ordre d'intervention de ces protéines au site d'endocytose.

5. Recrutement d'Alix aux sites d'endocytose de la CTxB

Alix, en plus de sa distribution homogène dans le cytoplasme, est présente à l'état basal au niveau de certaines régions de la membrane plasmique. Des expériences de FRAP nous ont permis de conclure qu'Alix semble associée à ces régions. De plus, l'ajout de CTxB à 4°C sur les cellules forme des patchs de CTxB concentrant Alix du côté cytoplasmique de la membrane plasmique. Ce phénomène signifie qu'Alix est recrutée au niveau de ces structures, et que ce recrutement semble spécifique puisque nous ne l'avons pas observé lorsque les cellules sont incubées avec de la transferrine. Nous avons également montré que le recrutement d'Alix Δ endophilin aux sites de la membrane qui concentrent la toxine n'est qu'en partie inhibé, ce qui suggère qu'Alix peut être recrutée indépendamment des endophilines.

Puisque les endophilines ne semblent pas être l'élément initiateur du recrutement d'Alix à la membrane plasmique, le partenaire nécessaire à ce processus reste à être identifié. Alix a la capacité de lier le LBPA et il a été montré récemment, dans le cadre de la réparation de la membrane plasmique, que la délétion du site d'interaction d'Alix avec le LBPA inhibe son recrutement au site de la blessure (Jimenez et al., 2014). Nous avons constaté que le mutant d'Alix incapable d'interagir avec les LBPA (Alix Δ LBPA) ne restaure que partiellement l'endocytose de la CTxB, ce qui évoque un rôle de la relation Alix/LBPA dans la CIE. Cependant, il semble que ce lipide est spécifiquement retrouvé au niveau des MVB et semble absent de la membrane plasmique (Matsuo et al., 2004). Toutefois, il est possible que ce site d'interaction permette à Alix d'interagir avec un autre lipide présent à la membrane plasmique. Afin de vérifier cette hypothèse, des tests d'interaction d'Alix avec les lipides retrouvés au niveau de la membrane plasmique pourraient être réalisés. Enfin, pour conclure sur le rôle de ce site d'interaction pour la localisation d'Alix à la membrane plasmique, il sera intéressant de voir si Alix Δ LBPA est toujours recrutée aux patchs formés par la CTxB.

Un des partenaires majeurs d'Alix est Alg-2, un senseur calcique à domaine penta EF. Récemment, il a été montré dans le cadre de la réparation de la membrane plasmique, qu'Alg-2 permet de recruter Alix de façon calcium dépendante (Scheffer et al., 2014). Alix recrute

ensuite les protéines ESCRT à la membrane plasmique, permettant la réparation de la blessure (Jimenez et al., 2014). Dans le cadre de l'internalisation, la liaison de ligands multivalents comme la CTxB, sur le glycosphingolipide GM1, ou des anticorps sur des récepteurs, entraîne le rassemblement de domaines lipidiques qui vont moduler la tension locale de la membrane (Stefl et al., 2012). Des mécanosenseurs, sont capables de s'ouvrir en réponse à l'augmentation de la tension (Apodaca et al., 2002 ; Haswell et al., 2011) et ainsi induire une augmentation de la concentration intracytoplasmique locale en calcium. Ce phénomène pourrait être à l'origine du recrutement d'Alg-2 et en conséquence celui d'Alix à la membrane plasmique lors de l'internalisation de la CTxB (Figure 47). Afin de vérifier cette hypothèse, la localisation d'Alg-2 au niveau des patchs de CTxB à la membrane plasmique devra être étudiée. Le recrutement d'Alix aux patchs de CTxB dans des cellules déplétées en Alg-2 devrait, si l'hypothèse est vraie, être inhibé. Nous avons déjà montré qu'Alix Δ Alg-2 ne restaure pas l'internalisation de la CTxB laissant penser que la relation Alix/Alg-2 est nécessaire pour l'internalisation de la CTxB. Il sera intéressant d'analyser le recrutement du mutant Alix Δ Alg-2 aux sites d'entrée de la toxine. Enfin, pour confirmer un rôle d'Alg-2 dans la CIE dépendante d'Alix, l'inhibition de l'ouverture des mécanosenseurs ou l'utilisation de chélateur de calcium extra cellulaire (EGTA), suivie de l'analyse du recrutement des protéines aux patchs de CTxB et de l'endocytose de la toxine dans les MEF wt et ko Alix peut être envisagée.

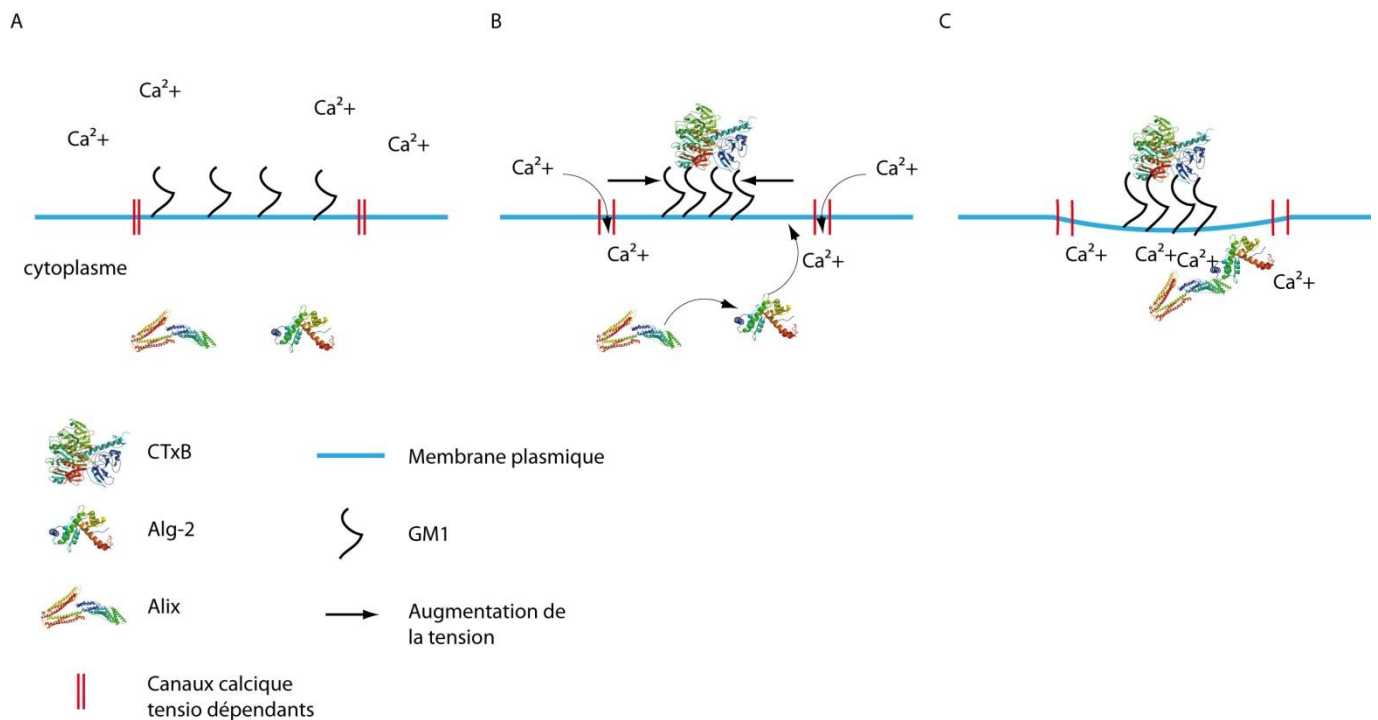


Figure 47: Hypothèse du rôle d'Alg-2 dans le recrutement d'Alix au site d'entrée de la CTxB

A) La membrane est « détendue », les canaux calciques tensio-dépendants sont fermés, les glycosphingolipides GM1 sont éloignés les uns des autres et Alix et Alg-2 sont « diffuses » dans le cytoplasme.

B) La liaison de la CTxB regroupe les molécules de GM1, ce qui est à l'origine d'une tension exercée sur la membrane plasmique et entraîne l'ouverture des canaux calciques. Le calcium entre dans la cellule, recrute Alg-2 à la membrane plasmique et entraîne l'interaction d'Alix avec Alg-2.

C) Alix et Alg-2 forment un complexe avec d'autres protéines (endophilines et CIN85 par exemple (non représentées)), ce qui entraîne la déformation de la membrane plasmique et l'internalisation de la toxine.

6. L'inhibition de la CIE dans les MEF ko Alix est associée à des perturbations de la physiologie cellulaire

Il a été montré que la CIE est importante pour réguler la migration ainsi que l'adhésion cellulaire (Howes et al., 2010) en permettant notamment de remodeler la membrane plasmique et de retirer rapidement les protéines d'adhésion présentes à la surface de la cellule. C'est le cas par exemple de l'intégrine $\beta 1$, un cargo CIE (Boucrot et al., 2014), qui interagit avec la matrice extra cellulaire. L'intégrine $\beta 1$ doit être rapidement endocytée, (pour permettre à la membrane de se détacher de son substrat), puis recyclée pour permettre à la membrane de ré-adhérer au substrat. Ce cycle d'endocytose/recyclage permet ainsi à la cellule

de se mouvoir. Si l'endocytose de l'intégrine $\beta 1$ est inhibée, la cellule sera en conséquence moins mobile. De façon intéressante, nous avons observé que la migration et l'étalement des MEF ko Alix sont diminués par rapport aux MEF contrôles (article Figure 7, S3). Cette inhibition est de plus corrélée à une baisse de l'internalisation de l'intégrine $\beta 1$ dans les MEF ko Alix. Nous avons également montré que la vitesse de migration des cellules ko Alix est restaurée par l'expression d'Alix wt mais pas par l'expression d'Alix Δ endophiline. Alix et les endophilines agissent donc, de concert, pour contrôler la CIE de l'intégrine $\beta 1$ et la mobilité cellulaire.

Ce phénomène de mobilité cellulaire est particulièrement important pour les neurones, notamment au niveau du cône de croissance qui doit atteindre sa cible souvent située à une distance importante. Il est intéressant de noter que Marine Laporte, une doctorante du laboratoire qui travaille sur le rôle d'Alix au niveau neuronal a constaté un problème de mobilité du cône de croissance, qui pourrait résulter d'un problème de CIE.

Récemment, de plus en plus d'études décrivent l'importance de la CIE pour la cellule neuronale, notamment pour le fonctionnement de la synapse (Kononenko et al., 2014 ; Watanabe et al., 2015 ; Wu et al., 2014). En effet, lors d'une intense stimulation neuronale, un grand nombre de vésicules synaptiques vont fusionner avec la membrane axonale. La cellule doit alors retirer cet excès de membrane par une endocytose de masse (bulk endocytosis) qui entraîne la formation d'une grosse vésicule. Ce processus de bulk endocytosis a été proposé pour être assuré par la CIE (Watanabe et al., 2015). Les endophilines ont déjà été impliquées dans ce type de phénomène au niveau de synapses de rétine (Llobet et al., 2011). De façon très intéressante, des travaux menés au laboratoire ont montré, que le « bulk endocytosis » semble fortement inhibé dans les neurones issus de souris ko Alix. Si ces résultats se confirment, la souris ko Alix qui est viable et fertile, par opposition aux souris triple ko endophilines (Milosevic et al., 2011), serait un outil parfait pour étudier le rôle exact de la CIE au niveau neuronal.

Enfin, nous avons montré, en collaboration avec l'équipe de Christophe Lamaze, que la signalisation induite par l'IL2R est fortement inhibée dans les MEFs ko Alix. Il a depuis longtemps été montré que l'IL2R est endocyté par CIE (Lamaze et al., 2001) et que la stimulation de l'IL2R par l'IL2 active la voie JAK/STAT. L'inhibition de la voie JAK/STAT dans les MEF ko Alix suggère donc que l'internalisation de l'IL2R pourrait être dépendante d'Alix. Des expériences d'internalisation de l'IL2R sont actuellement en cours au laboratoire. Il est intéressant de noter à ce stade que l'IL2R a été décrit pour être internalisé par la voie médiée par les endophilines (Boucrot et al., 2014). Dans de nombreux cas, l'internalisation

d'un récepteur est associée à l'arrêt de sa signalisation. Hors nous avons observé une inhibition de la signalisation de l'IL2R en absence d'Alix qui serait associée, selon notre hypothèse, à une diminution de son internalisation. Si cette hypothèse s'avère exacte, elle signifiera que l'IL2R doit être internalisé pour prolonger sa signalisation depuis l'endosome (signaling endosome).

7. Conclusion générale

Au final, ce travail de thèse nous a permis de mettre en évidence un rôle inattendu, de la protéine Alix. En effet, aux vues des partenaires moléculaires d'Alix et des études ayant décrit son rôle au niveau du MVB, nous nous attendions à découvrir de grosses perturbations des compartiments endocytaires dans les MEF ko Alix. Pourtant, tel n'a pas été le cas et nous avons constaté un rôle beaucoup plus précoce d'Alix dans la voie endolysosomale. En effet, il c'est avéré que c'est l'étape d'internalisation à la membrane plasmique qui est principalement affectée par la déplétion d'Alix et cette altération ne concerne, de plus, que la CIE. Cette fonction d'Alix dépend de sa capacité à lier les endophilines A, interaction dont le rôle était jusqu'à présent méconnu, mais qui prend maintenant tout son sens. Cependant, il est encore difficile à l'heure actuelle de formuler une hypothèse sur le rôle moléculaire précis d'Alix dans la CIE, car de nombreuses pistes sont encore à explorer.

La CIE, en tant que voie d'endocytose spécifique, est un concept qui n'est réellement admis que depuis une quinzaine d'années. Cependant, de plus en plus d'étude concernant la CIE et son importance capitale, notamment pour le fonctionnement de la cellule neuronale, sont publiées. Ce travail ouvre donc de nouvelles perspectives, dans la compréhension du rôle cellulaire de la protéine Alix d'une part mais aussi, dans la compréhension du fonctionnement et du rôle physiologique de la CIE, de la cellule à l'organisme.

Références bibliographiques

A

- Abrami, L., L. Brandi, M. Moayeri, M.J. Brown, B.A. Krantz, S.H. Leppla, and F.G. van der Goot. (2013). Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell reports*.
- Aimon S, Callan-Jones A, Berthaud A, Pinot M, Toombes GE, Bassereau P. (2014). Membrane shape modulates transmembrane protein distribution. *Dev Cell*
- Altschuler Y, Liu S, Katz L, Tang K, Hardy S, Brodsky F, Apodaca G, Mostov K. (1999). ADP-ribosylation factor 6 and endocytosis at the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol*
- Antonescu CN, Foti M, Sauvonnnet N, Klip A. (2009). Ready, set, internalize: mechanisms and regulation of GLUT4 endocytosis. *Bioscience reports*
- Antonny B. (2011). Mechanisms of membrane curvature sensing. *Annual review of biochemistry*
- Apodaca G. (2002). Modulation of membrane trafficking by mechanical stimuli. *Am J Physiol Renal Physiol*
- Araki N, Johnson MT, Swanson JA. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *The Journal of cell biology*
- Aridor M, Hannan LA. (2002). Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport. *Traffic*.
- Avraham R, Yarden Y. (2011). Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nature reviews Molecular cell biology*

B

- Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD. (2002). Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell*
- Babst M, Katzmann DJ, Snyder WB, Wendland B, Emr SD. (2002). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*
- Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*
- Backer, J.M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem.J*
- Baietti, M.F., Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, Ivarsson Y, Depoortere F, Coomans C, Vermeiren E, Zimmermann P, David G. (2012) Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat. Cell Biol*
- Bainton DF. (1981). The discovery of lysosomes. *J Cell Biol*
- Balagopalan L, Valarie A. Barr, Lawrence E. Samelson. (2009). Endocytic events in TCR signaling: focus on adapters in microclusters. *Immunol Rev*
- Basquin C, Malarde V, Mellor P, Anderson DH, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC, Dautry-Varsat A, Sauvonnnet N. (2013). The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *Journal of cell science*
- Bastiani M, Parton RG. (2010). Caveolae at a glance. *J Cell Science*
- Beemiller P, Zhang Y, Mohan S, Levinsohn E, Gaeta I, Hoppe AD, Swanson JA. (2010). A Cdc42 activation cycle coordinated by PI 3-kinase during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Molecular biology of the cell*

- Benesch S, Polo S, Lai FP, Anderson KI, Stradal TE, Wehland J, Rottner K. (2005). N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci*
- Bhagatji P, Leventis R, Comeau J, Refaei M, Silviu JR. (2009). Steric and not structure-specific factors dictate the endocytic mechanism of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *The Journal of cell biology*
- Bieniasz PD. (2009). The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe*
- Bigay J, Casella JF, Drin G, Mesmin B, Antonny B. (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *The EMBO journal*
- Bissig C, Gruenberg J. (2013). *Lipid Sorting and Multivesicular Endosome Biogenesis*. Cold Spring Harb
- Bissig, C., M. Lenoir, M.C. Velluz, I. Kufareva, R. Abagyan, M. Overduin, and J. Gruenberg. 2013. Viral infection controlled by a calcium-dependent lipid-binding module in ALIX. *Dev Cell*
- Blouin CM, Lamaze C. (2013). Interferon gamma receptor: the beginning of the journey. *Front Immunol*
- Blum, D., Hemming, F. J., Galas, M. C., Torch, S., Cuvelier, L., Schiffmann, S. N. and Sadoul, R. (2004). Increased Alix (apoptosis-linked gene-2 interacting protein X) immunoreactivity in the degenerating striatum of rats chronically treated by 3-nitropropionic acid. *Neurosci Lett*
- Bodon G, Chassefeyre R, Pernet-Gallay K, Martinelli N, Effantin G, Hulsik DL, Belly A, Goldberg Y, Chatellard-Causse C, Blot B, Schoehn G, Weissenhorn W, Sadoul R. (2011). Charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) of the endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane. *J. Biol. Chem*
- Bohdanowicz M, Grinstein S. (2013). Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis and macropinocytosis. *Physiol Review*
- Bohdanowicz M, Schlam D, Hermansson M, Rizzuti D, Fairn GD, Ueyama T, Somerharju P, Du G, Grinstein S. (2013). Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes. *Molecular biology of the cell*
- Boisvert M, Tijssen P, (2012). Endocytosis of Non-Enveloped DNA Viruses. *Molecular Regulation of Endocytosis*
- Bongiovanni A, Romancino, Paterniti, Qiu, Moshiah, Di Felice, Vergani, Ustek, d'Azzo A. (2012). Alix Protein Is Substrate of Ozz-E3 Ligase and Modulates Actin Remodeling in Skeletal Muscle. *J Biol Chem*
- Boucrot E, Ferreira AP, Almeida-Souza L, Debard S, Vallis Y, Howard G, Bertot L, Sauvonnet N, McMahon HT. (2014). Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*
- Boucrot E, McMahon HT. (2011). Initiation de l'endocytose par vésicules de clathrine. *Medecine Sciences*
- Boulakirba S, Macia E, Partisani M, Lacas-Gervais S, Brau F, Luton F, Franco M. (2014). Arf6 exchange factor EFA6 and endophilin directly interact at the plasma membrane to control clathrin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci*
- Boulant S, Kural C, Zeeh JC, Ubelmann F, Kirchhausen T. (2011). Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nature cell biology*

- Bowers K, Piper S.C, Edeling M.A, Gray S.R, Owen D.J, Lehner P.J, Luzio J.P. (2006). Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally-ubiquitinated MHC classI is independent of mammalian ESCRTII. *J.Biol.Chem.*
- Bridge JA, Kanamori M, Ma Z, Pickering D, Hill DA, Lydiatt W, Lui MY, Colleoni GW, Antonescu CR, Ladanyi M, Morris SW. (2001). Fusion of the ALK gene to the clathrin heavy chain gene, CLTC, in inflammatory myofibroblastic tumor. *Am J Pathol.*
- Brown FD, Rozelle AL, Yin HL, Balla T, Donaldson JG. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *J Cell Biol*
- Bryant NJ, Stevens TH. (1998). Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev*
- Bu W, Chou AM, Lim KB, Sudhakaran T, Ahmed S. (2009). The Toca-1-N-WASP complex links filopodial formation to endocytosis. *The Journal of biological chemistry*

C

- Cabezas, A., K.G. Bache, A. Brech, and H. Stenmark. (2005). Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes. *J Cell Sci.*
- Cao H, Chen J, Krueger EW, McNiven MA. (2010). SRC-mediated phosphorylation of dynamin and cortactin regulates the "constitutive" endocytosis of transferrin. *Molecular and cellular biology*
- Capraro BR, Yoon Y, Cho W, Baumgart T. (2010). Curvature sensing by the epsin N-terminal homology domain measured on cylindrical lipid membrane tethers. *Journal of the American Chemical Society*
- Carlson L, Hurley J. (2012). In vitro reconstitution of the ordered assembly of the Endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. *PNAS*
- Carlton JG, Agromayor M, Martin-Serrano J. (2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci*
- Carlton JG, Martin-Serrano J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*
- Caron E, Hall A. (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*
- Casey PJ. (1995). Protein lipidation in cell signaling. *Science*
- 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*
- Chadda R, Howes MT, Plowman SJ, Hancock JF, Parton RG, Mayor S. (2007). Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic*
- Chassefeyre R, Martinez-Hernandez J, Bertaso F, Bouquier N, Blot B, Couté Y, Devoy A, Isaacs A, Pernet-Gallay K, Sadoul R, Fagni L, Goldberg Y. (2015). Regulation of Postsynaptic Function by the Dementia-Related ESCRT-III Subunit CHMP2B. *Journal of Neurosci*
- Chatellard-Causse, C., B. Blot, N. Cristina, S. Torch, M. Missotten, and R. Sadoul. (2002). Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem*
- Chaudhary N, Gomez GA, Howes MT, Lo HP, McMahon KA, Rae JA, Schieber NL, Hill MM, Gaus K, Yap AS, Parton RG. (2014). Endocytic crosstalk: cavins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis. *PLoS Biol*

Chen H, Fre S, Slepnev VI, Capua MR, Takei K, Butler MH, Di Fiore PP, De Camilli P. (1998). Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature*

Chen HY, Fermin A, Vardhana S, Weng IC, Lo KF, Chang EY, Maverakis E, Yang RY, Hsu DK, Dustin ML, Liu FT. (2009). Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4⁺ T-cell activation at the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci*

Chen, B., Borinstein, S. C., Gillis, J., Sykes, V. W. and Bogler, O. (2000). The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. *J Biol Chem*

Chevallier, J. Chamoun Z, Jiang G, Prestwich G, Sakai N, Matile S, Parton RG, Gruenberg J. (2008). Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J. Biol. Chem*

Chu T, Sun J, Saksena S, Emr SD. (2006). New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J Cell Biol*

Cocucci E, Aguet F, Boulant S, Kirchhausen T. (2012). The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*

Collins A, Warrington A, Taylor KA, Svitkina T. (2011). Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Current biology*

Colucci-Guyon E, Niedergang F, Wallar BJ, Peng J, Alberts AS, Chavrier P. (2005). A role for mammalian diaphanous-related formins in complement receptor (CR3)-mediated phagocytosis in macrophages. *Current biology*

Coppolino MG, Dierckman R, Loijens J, Collins RF, Pouladi M, Jongstra-Bilen J, Schreiber AD, Trimble WS, Anderson R, Grinstein S. (2002). Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase I α impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *The Journal of biological chemistry*

Cossec JC, Simon A, Marquer C, Moldrich RX, Leterrier C, Rossier J, Duyckaerts C, Lenkei Z, Potier MC. (2010). Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochimica et biophysica acta*

Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Luthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, McCormick DA, De Camilli P. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*

D

Damke H, Baba T, Warnock DE, Schmid SL. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *The Journal of cell biology*

Daumke, O., Roux, A., Haucke, V. (2014) BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell*

De Melker AA, van der Horst G, Calafat J, Jansen H, Borst J. (2001). c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *Journal of cell science*

Derivery E, Lombard B, Loew D, Gautreau A. (2009). The Wave complex is intrinsically inactive. *Cell motility and the cytoskeleton*

Derivery E, Sousa C, Gautier JJ, Lombard B, Loew D, Gautreau A. (2009). The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Developmental cell*

- Dharmawardhane S, Schürmann A, Sells M, Chernoff J, Schmid S¹ and Bokoch G. (2000). Regulation of Macropinocytosis by p21-activated Kinase-1. *Mol Biol Cell*.
- Diril MK, Wienisch M, Jung N, Klingauf J, Haucke V. (2006). Stonin 2 is an AP-2-dependent endocytic sorting adaptor for synaptotagmin internalization and recycling. *Developmental cell*
- Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry* 78: 857-902
- Dominguez R, Holmes KC. (2011). Actin structure and function. *Annual review of biophysics*
- Donaldson JG, Jackson CL. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*
- Dores, M.R, Paing MM, Lin H, Montagne WA, Marchese A, Trejo J. (2012) AP-3 regulates PAR1 ubiquitin-independent MVB/lysosomal sorting via an ALIX-mediated pathway. *Mol. Biol. Cell*
- Dores, M.R, Buxin Chen,¹ Huilan Lin,¹ Unice J.K. Soh,¹ May M. Paing,³ William A. Montagne,¹ Timo Meerloo,² and JoAnn Trejo. (2012). ALIX binds a YPX(3)L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J.Cell Biol.*
- Dowlatshahi, D.P. et al. (2012). ALIX is a Lys63-specific polyubiquitin binding protein that functions in retrovirus budding. *Dev. Cell*
- Doyotte A, Russell MR, Hopkins CR, Woodman PG. (2005). Depletion of TSG101 forms a mammalian "Class E" compartment: a multicisternal early endosome with multiple sorting defects. *J Cell Sci*
- Doyotte, A. Mironov A, McKenzie E, Woodman P. (2008) The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*
- Drin G, Casella JF, Gautier R, Boehmer T, Schwartz TU, Antonny B. (2007). A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nature structural & molecular biology*
- Dulhunty AF, Franzini-Armstrong C. (1975). The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *The Journal of physiology*

E

- Edwards RA, Bryan J. (1995). Fascins, a family of actin bundling proteins. *Cell motility and the cytoskeleton*
- Eikenes ÅH, Malerød L, Christensen AL, Steen CB, Mathieu J, Nezis IP, Liestøl K, Huynh JR, Stenmark H, Haglund K. (2015). ALIX and ESCRT-III Coordinately Control Cytokinetic Abcission during Germline Stem Cell Division In Vivo. *PLoS Genet*
- Evergren E, Gad H, Walther K, Sundborger A, Tomilin N, Shupliakov O. (2007). Intersectin is a negative regulator of dynamin recruitment to the synaptic endocytic zone in the central synapse. *The Journal of neuroscience*
- Ewers H and Helenius A. (2011). Lipid Mediated Endocytosis. *Cold. Spring Herb Pers Biol*

Ewers H, Romer W, Smith AE, Bacia K, Dmitrieff S, Chai W, Mancini R, Kartenbeck J, Chambon V, Berland L, et al. (2010). GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nat Cell Biol* 12: 11–18.

Eyster CA, Higginson JD, Huebner R, Porat-Shliom N, Weigert R, Wu WW, Shen RF, Donaldson JG. (2009). Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. *Traffic*

F

Falguières T, Luyet PP, Bissig C, Scott CC, Velluz MC, Gruenberg J. (2008). In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol Biol Cell*.

Fattakhova G, Masilamani M, Borrego F, Gilfillan AM, Metcalfe DD, Coligan JE. (2006). The high-affinity immunoglobulin-E receptor (FcεRI) is endocytosed by an AP-2/clathrin-independent, dynamin-dependent mechanism. *Traffic*

Felder S, Miller K, Moehren G, Ullrich A, Schlessinger J, Hopkins CR. (1990). Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell*

Ferguson SS, Downey WE, 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG. (1996). Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science*

Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerod L, Fisher EMC, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A. (2007). Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol*

Firat-Karalar EN, Welch MD. (2011). New mechanisms and functions of actin nucleation. *Current opinion in cell biology*

Fisher, R. D, Chung, H. Y., Zhai, Q, Robinson, H., Sundquist, W. I. and Hill, C. P. (2007). Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell*

Fivaz M, Vilbois F, Thurnheer S, Pasquali C, Abrami L, Bickel PE, Parton RG, van der Goot FG. (2002). Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. *The EMBO journal*

Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual review of pathology*

Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, McMahon HT. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*

Fra A. M, Masserini M, Palestini P, Sonnino S, Simons K. (1995). A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett*.

Frank PG, Pavlides S, Lisanti MP. (2009). Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell and tissue research*

Frick M, Bright NA, Riento K, Bray A, Merrified C, Nichols BJ. (2007). Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Current biology*

Frost A, Unger VM, DeCamilli P. (2009). The BAR domain superfamily: Membrane-molding macromolecules. *Cell* 137: 191–196.

Futter, C.E., A. Pearce, L.J. Hewlett, and C.R. Hopkins. 1996. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*

G

- Gaffen SL. (2001). Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*
- Gallop JL, McMahon HT. (2005). BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochemical Society symposium*
- Garrett WS, Chen LM, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, Trombetta S, Galan JE, Mellman I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell*
- Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Cote M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*
- Gauthier NC, Rossier OM, Mathur A, Hone JC, Sheetz MP (2009) Plasma membrane area increases with spread area by exocytosis of a GPI-anchored protein compartment. *Mol Biol Cell*
- Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, Gaillard CB, Bouchet J, Vitale N, Slavík J, Machala M, Zimmermann P. (2014). Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun*
- Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, Gaullier JM, Parton RG, Stenmark H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J*
- Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature cell biology*
- Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR. (2008). Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev.*
- Gorden P, Carpentier JL, Cohen S, Orci L. (1978). Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization, and lysosomal association in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*
- Goswami D, Gowrishankar K, Bilgrami S, Ghosh S, Raghupathy R, Chadda R, Vishwakarma R, Rao M, Mayor S. (2008). Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell*
- Gottfried I, Ehrlich M, Ashery U. (2009). HIP1 exhibits an early recruitment and a late stage function in the maturation of coated pits. *Cellular and molecular life sciences*
- Gowrishankar K, Ghosh S, Saha S, C R, Mayor S, Rao M. (2012). Active remodeling of cortical actin regulates spatiotemporal organization of cell surface molecules. *Cell*.
- Grandal MV, Zandi R, Pedersen MW, Willumsen BM, vanDeurs B, Poulsen HS. (2007). EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes. *Carcinogenesis*
- Grant BD, Donaldson JG. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*
- Grassart A, Dujeancourt A, Lazarow PB, Dautry-Varsat A, Sauvonnnet N. (2008). Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO reports*
- Grassart A, Meas-Yedid V, Dufour A, Olivo-Marin JC, Dautry-Varsat A, Sauvonnnet N. (2010). Pak1 phosphorylation enhances cortactin-N-WASP interaction in clathrin-caveolin-independent endocytosis. *Traffic*
- Green R, Paluch E, Oegema K. (2012). Cytokinesis in animal cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*
- Gruenberg j, Stenmark H,. (2004). The biogenesis of multivesicular endosome. *Nat Rev Mol Cell Biol*

Gruenberg, J., G. Griffiths, and K.E. Howell. (1989). Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J. Cell Biol.*

Guizetti J, Schermelleh L, Mäntler J, Maar S, Poser I, Leonhardt H, Müller-Reichert T, Gerlich DW. (2011). Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science*

Gupta GD, Swetha MG, Kumari S, Lakshminarayan R, Dey G, Mayor S. (2009). Analysis of endocytic pathways in *Drosophila* cells reveals a conserved role for GBF1 in internalization via GEECs. *PLoS ONE*

H

Haglund K, Dikic Y. (2012). The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J cell science*

Haigler HT, McKanna JA, Cohen S. (1979). Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A-431 by epidermal growth factor. *The Journal of cell biology*

Hansen CG, Howard G, Nichols BJ. (2011). Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *Journal of cell science*

Hanson PI, Cashikar A. (2012). Multivesicular body morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*

Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT III protein filaments. *J Cell Biol*

Haswell E, Phillips R, Rees D. (2011). Mechano sensitive Channels: What Can They Do and How Do They Do It?. *Structure*

Hasegawa J, Tsujita K, Takenawa T, Itoh T. (2012). ARAP1 regulates the ring size of circular dorsal ruffles through Arf1 and Arf5. *Molecular biology of the cell*

Hawryluk MJ, Keyel PA, Mishra SK, Watkins SC, Heuser JE, Traub LM. (2006). Epsin 1 is a polyubiquitin-selective clathrin-associated sorting protein. *Traffic*

Heckel T, Czupalla C, Expirto Santo AI, Anitei M, Arantzazu Sanchez-Fernandez M, Mosch K, Krause E, Hoflack B. (2009). Src-dependent repression of ARF6 is required to maintain podosome-rich sealing zones in bone-digesting osteoclasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

Helenius A, Mellman I, Wall D, Hubbard A. (1983) Endosomes. *Trends Biochem Sci*

Helfrich W. (1973). Elastic properties of lipid bilayers: Theory and possible experiments. *Zur Naturforschung* 28c: 693–703.

Hemar A, Lieb M, Subtil A, DiSanto JP, Dautry-Varsat A. (1994). Endocytosis of the beta chain of interleukin-2 receptor requires neither interleukin-2 nor the gamma chain. *European journal of immunology*

Hemming, F. J., Fraboulet, S., Blot, B. and Sadoul, R. (2004). Early increase of apoptosis-linked gene-2 interacting protein X in areas of kainate-induced neurodegeneration. *Neuroscience*

Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD. (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell*

Henne WM, Boucrot E, Meinecke M, et al. (2010). FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science*

- Henne WM, Buchkovich NJ, Zhao Y, Emr SD. (2012). The endosomal sorting complex ESCRT-II mediates the assembly and architecture of ESCRT-III helices. *Cell*
- Henne WM, Kent HM, Ford MGJ, Hegde BG, Daumke O, Butler PJG, Mittal R, Langen R, Evans PR, McMahon HT. (2007). Structure and analysis of FCHO2 F-BAR domain: A dimerizing and membrane recruitment module that affects membrane curvature. *Structure* 15: 839–852.
- Heuser J. (1980). Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J Cell Biol*
- Higgs HN, Pollard TD. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *The Journal of cell biology*
- Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, Kirkham M, Kirkham A, Nixon SJ, Walser P, Abankwa D, Oorschot VM, Martin S, Hancock JF, Parton RG. (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*
- Howes MT, Kirkham M, Riches J, Cortese K, Walser PJ, Simpson F, Hill MM, Jones A, Lundmark R, Lindsay MR, Hernandez-Deviez DJ, Hadzic G, McCluskey A, Bashir R, Liu L, Pilch P, McMahon H, Robinson PJ, Hancock JF, Mayor S, Parton RG. (2010). Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *The Journal of cell biology*
- Hu C, Coughlin M, Mitchison T. (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol Biol Cell*
- Huang F, Khvorova A, Marshall W, Sorkin A. (2004). Analysis of clathrin-mediated endocytosis of epidermal growth factor receptor by RNA interference. *The Journal of biological chemistry*
- Huotari J, Helenius A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J*
- Hurley JH, Odorizzi G. (2012). Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol*
- Hurley, J.H. and Hanson, P.I. (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat Rev Mol Cell Biol*

I

- Innocenti M, Gerboth S, Rottner K, Lai FP, Hertzog M, Stradal TE, Frittoli E, Didry D, Polo S, Disanza A, Benesch S, Di Fiore PP, Carlier MF, Scita G. (2005). Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nature cell biology*

J

- Janmey PA, Kinnunen PK. (2006). Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol*.
- Jenkins GM, Frohman MA. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. *Cellular and molecular life sciences*
- Jia, J., Tarabykina, S., Hansen, C., Berchtold, M. and Cygler, M. (2001). Structure of apoptosis-linked protein ALG-2: insights into Ca²⁺-induced changes in penta-EF-hand proteins. *Structure*
- Jiang X, Huang F, Marusyk A, Sorkin A. (2003). Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Molecular biology of the cell*
- Jimenez, A.J., P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvore, S. Divoux, M. Piel, and F. Perez. 2014. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*

Johannes L, Mayor S. (2010). Induced domain formation in endocytic invagination, lipid sorting, and scission. *Cell*

Johannes L, Wunder C and Bassereau P. (2014). Endocytic Pathways A Cocktail of Biophysical Modules to Build Bending "On the Rocks". *Cold Spring Harb Perspect Biol*

Jost M, Simpson F, Kavran JM, Lemmon MA, Schmid SL. (1998). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Current biology*

Jouvenet N, Maria Zhadina M, Paul D. Bieniasz P, and Sanford M. Simon S. (2011). Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat Cell Biol.*

K

Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. (2006). Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*

Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cel.*

Katzmann DJ, Stefan CJ, Babst M, Emr SD. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol*

Kazazic M, Roepstorff K, Johannessen LE, Pedersen NM, van Deurs B, Stang E, Madhus IH. (2006). EGF-induced activation of the EGF receptor does not trigger mobilization of caveolae. *Traffic*

Kerr MC, Teasdale RD (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic*

Keyel PA, Mishra SK, Roth R, Heuser JE, Watkins SC, Traub LM. (2006). A single common portal for clathrin-mediated endocytosis of distinct cargo governed by cargo-selective adaptors. *Molecular biology of the cell*

King IC, Sartorelli AC. (1986). The relationship between epidermal growth factor receptors and the terminal differentiation of A431 carcinoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*

Kirchhausen T, Macia E, Pelish HE. (2008). Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods in enzymology*

Kirchhausen T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*

Kirchhausen, T, Owen D, Harrison S. (2014). Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic. *Cold. Spring. Harb*

Kirchhausen, T. (2012). Bending membranes. *Nat. Cell Biol.*

Kirkham M, Parton RG. (2005). Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochimica et biophysica acta*

Klumperman J, Raposo G. (2014). The Complex Ultrastructure of the Endolysosomal System. *Cold Spring Harb Perspect Biol*

Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G. and Gruenberg, J. (1998). A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature*

Kononenko, N.L., D. Puchkov, G.A. Classen, A.M. Walter, A. Pechstein, L. Sawade, N. Kaempfer, T. Trimbuch, D. Lorenz, C. Rosenmund, T. Maritzen, and V. Haucke. 2014. Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron*

Koster G, Van Duijn M, Hofs B, Dogterom M. (2003). Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. *Proc Natl Acad Sci* 100:15583–15588.

Koyasu S. (2003). The role of PI3K in immune cells. *Nature immunology*

Krauss M, Kinuta M, Wenk MR, De Camilli P, Takei K, Haucke V. (2003). ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J Cell Biol*

Krugmann S, Jordens I, Gevaert K, Driessens M, Vandekerckhove J, Hall A. (2001). Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Current biology*

Ku P, Bendjennat M, Ballew J, Landesman M, Saffarian S (2014). ALIX Is Recruited Temporarily into HIV-1 Budding Sites at the End of Gag Assembly. *PLoS One*

Kumari S, Borroni V, Chaudhry A, Chanda B, Massol R, Mayor S, Barrantes FJ. (2008). Nicotinic acetyl choline receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. *JCellBiol*

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

L

Lacana, E., Ganjei, J. K., Vito, P. and D'Adamio, L. (1997). Dissociation of apoptosis and activation of IL-1beta-converting enzyme/Ced-3 proteases by ALG-2 and the truncated Alzheimer's gene ALG-3. *J Immunol*

Lajoie P, Nabi IR. (2010). Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis. *International review of cell and molecular biology*

Lakshminarayan R, Wunder C, Becken U, Howes MT, Benzing C, Arumugam S, Sales S, Ariotti N, Chambon V, Lamaze C, Loew D, Shevchenko A, Gaus K, Parton RG, Johannes L. (2014). Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat Cell Biol*

Lamaze C, Dujancourt A, Baba T, Lo CG, Benmerah A, Dautry-Varsat A. (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Molecular cell*

Lamaze C, Schmid SL. 1995. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr Opin Cell Biol*.

Lambert JC et al., (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genetic*

Le Blanc, I., P.P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petiot, N. Mayran, N. Demareux, J. Faure, R. Sadoul, R.G. Parton, and J. Gruenberg. (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol*.

Le Clainche C, Carlier MF. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews*

- Lee J-A, Beigneux A, Ahmad ST, Young SG, Gao F-B. (2007). ESCRT-III Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. *Current Biology*
- Lee SM, Chin LS, Li L. (2012). Charcot-Marie-Tooth disease linked protein SIMPLE function with ESCRT machinery in endosomal trafficking. *J Cell Biol*
- Lemmon MA, Schlessinger J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*
- Lemmon MA. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature reviews Molecular cell biology*
- Lewis W. (1931) Pinocytosis. *Johns Hopkins Hosp. Bull.*
- Li L, Cohen SN. (1996). Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell*.
- Lichte B, Veh RW, Meyer HE, Kilimann MW (1992) Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *The EMBO journal* 11: 2521-2530
- Lim JP, Gleeson PA. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and cell biology*
- Lim KB, Bu W, Goh WI, Koh E, Ong SH, Pawson T, Sudhakaran T, Ahmed S. (2008). The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics. *The Journal of biological chemistry*
- Lingwood D, Simons K.(2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*.
- Linkermann A, Gelhaus C, Lettau M, Qian J, Kabelitz D, Janssen O. (2009). Identification of interaction partners for individual SH3 domains of Fas ligand associated members of the PCH protein family in T lymphocytes. *Biochimica et biophysica acta*
- Liu L, Brown D, McKee M, Lebrasseur NK, Yang D, Albrecht KH, Ravid K, Pilch PF. (2008). Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell metabolism*
- Liu W, Hsu DK, Chen HY, Yang RY, Carraway KL 3rd, Isseroff RR, Liu FT. (2012). Galectin-3 regulates intracellular trafficking of EGFR through Alix and promotes keratinocyte migration. *J Invest Dermatol*
- Llobet, A., J.L. Gallop, J.J. Burden, G. Camdere, P. Chandra, Y. Vallis, C.R. Hopkins, L. Lagnado, and H.T. McMahon. 2011. Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *J Neurosci*
- Ludwig A, Otto G, Riento K, Hams E, Fallon P, Nichols B. (2010). Flotillin microdomains interact with the cortical cytoskeleton to control uropod formation and neutrophil recruitment. *J Cell Biol*
- Luhtala, N. and Odorizzi, G. (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol*
- Lundmark R, Doherty GJ, Howes MT, Cortese K, Vallis Y, Parton RG, McMahon HT. (2008). The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Current biology*
- Luyet, P.P. Falguières T, Pons V, Pattnaik AK, Gruenberg J. (2008). The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA. *Traffic*
- Luzio JP, Gray SR, Bright NA. (2010). Endosome–lysosomefusion. *Biochem Soc Trans*

M

- Machesky LM, Johnston SA. (2007). MIM: a multifunctional scaffold protein. *J Mol Med (Berl)*
- Madsen KL, Bhatia VK, Gether U, Stamou D. (2010). BAR domains, amphipathic helices and membrane-anchored proteins use the same mechanism to sense membrane curvature. *FEBS letters*
- Mahul-Mellier, A.L., F. Strappazzon, A. Petiot, C. Chatellard-Causse, S. Torch, B. Blot, K. Freeman, L. Kuhn, J. Garin, J.M. Verna, S. Fraboulet, R. Sadoul, and F.J. Hemming. 2008. Alix and ALG-2 are involved in tumor necrosis factor receptor 1-induced cell death. *J Biol Chem*
- Mahul-Mellier, A.L., F.J. Hemming, B. Blot, S. Fraboulet, and R. Sadoul. 2006. Alix, making a link between apoptosis-linked gene-2, the endosomal sorting complexes required for transport, and neuronal death in vivo. *J Neurosci*
- Maki, M., Kitaura, Y., Satoh, H., Ohkouchi, S. and Shibata, H. (2002). Structures, functions and molecular evolution of the penta-EF-hand Ca²⁺-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*
- Maldonado-Báez L, Williamson C, Donaldson JG. (2013). Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view. *Exp Cell Res*
- Martinez-Martin N, Fernández-Arenas E, Cemurski S, Delgado P, Turner M, Heuser J, Irvine DJ, Huang B, Bustelo XR, Shaw A, Alarcón B. (2011). T cell receptor internalization from the immunological synapse is mediated by TC21 and RhoG GTPase-dependent phagocytosis. *Immunity*.
- Matsui S, Matsumoto S, Adachi R, Kusui K, Hirayama A, Watanabe H, Ohashi K, Mizuno K, Yamaguchi T, Kasahara T, Suzuki K. (2002). LIM kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells. Possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*
- Matsuo, H., J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N.S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R.G. Parton, F. Vilbois, and J. Gruenberg. (2004). Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*
- May RC, Caron E, Hall A, Machesky LM. (2000). Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nature cell biology*
- Mayor S, Parton RG, Donaldson JG. (2014). Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*
- Mayor S, Parton, Donaldson J. (2014). Clathrin-Independent Pathways of Endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*
- McCullough HT, Colf LA, Sundquist WI. (2013). Membrane fission reaction of the Mammalian ESCRT pathway. *Annu. Rev. Biochem*
- McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H, Wong TW. (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *The Journal of cell biology*
- Meinecke M, Boucrot E, Camdere G, Hon WC, Mittal R, McMahon HT. (2013). Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *J.Biol.Chem*
- Meister M, Tikkanen R. (2014).Endocytic Trafficking of Membrane-Bound Cargo: A Flotillin Point of View. *Membranes*
- Mellman I, YardenY. (2013). Endocytosis and Cancer. *Cold.Spring.Harb*

- Mercer J, Helenius A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol.*
- Merrifield C. (2012). Fishing for clathrin coated pit nucleator. *Nat.Cell.Biol*
- Mesaki K, Tanabe K, Obayashi M, Oe N, Takei K. (2011). Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS ONE*
- Mettlen M, Stoeber M, Loerke D, Antonescu CN, Danuser G, Schmid SL. (2009). Endocytic accessory proteins are functionally distinguished by their differential effects on the maturation of clathrin-coated pits. *Molecular biology of the cell*
- Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *The EMBO journal*
- Miki H, Yamaguchi H, Suetsugu S, Takenawa T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*
- Millard TH, Bompard G, Heung MY, Dafforn TR, Scott DJ, Machesky LM, Futterer K. (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *The EMBO journal*
- Milosevic, I., S. Giovedi, X. Lou, A. Raimondi, C. Collesi, H. Shen, S. Paradise, E. O'Toole, S. Ferguson, O. Cremona, and P. De Camilli. (2011). Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron.*
- Mim C, Unger VM. (2012). Membrane curvature and its generation by BAR proteins. *Trends Biochem Sci* 37: 526–533.
- Missotten, M., A. Nichols, K. Rieger, and R. Sadoul. 1999. Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein. *Cell Death Differ.*
- Moberg KH, Schelble S, Burdick SK, Hariharan IK. (2005). Mutations in *erupted*, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev Cell.*
- Monzo, P., Gauthier, N.C., Keslair, F., Loubat, A., Field, C.M., Le Marchand-Brustel, Y., and Cormont, M. (2005). Clues to CD2-associated protein involvement in cytokinesis. *Molecular biology of the cell*
- Mooren OL, Galletta BJ, Cooper JA. (2012). Roles for actin assembly in endocytosis. *Annual review of biochemistry*
- Morelon E, Dautry-Varsat A, Le Deist F, Hachein-Bay S, Fischer A, de Saint Basile G. (1996). T-lymphocyte differentiation and proliferation in the absence of the cytoplasmic tail of the common cytokine receptor gamma c chain in a severe combined immune deficiency X1 patient. *Blood*
- Morelon E, Dautry-Varsat A. (1998). Endocytosis of the common cytokine receptor gamma c chain. Identification of sequences involved in internalization and degradation. *The Journal of biological chemistry*
- Morita E, Sandrin V, Alam SL, Eckert DM, Gygi SP, Sundquist WI. (2007). Identification of human MVB12 proteins as ESCRT-I subunits that function in HIV budding. *Cell Host Microbe*
- Morita E, Sundquist WI. (2004). Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol*
- Morlot S, Galli V, Klein M, Chiaruttini N, Manzi J, Humbert F, Dinis L, Lenz M, Cappello G, Roux A. (2012). Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell*

Murrow L, Malhotra R, Debnath J. (2015). ATG12-ATG3 interacts with Alix to promote basal autophagic flux and late endosome function. *Nat Cell Biol*

N

Nakagawa H, Miki H, Nozumi M, Takenawa T, Miyamoto S, Wehland J, Small JV. (2003). IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *Journal of cell science*

Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. (2003). Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Mol Biol Cell*

Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG. (2004). Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol Biol Cell*

Nichols BJ, Kenworthy AK, Polishchuk RS, Lodge R, Roberts TH, et al. (2001). Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.*

Nixon RA. (2005). Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging*.

Nürnberg A, Kitzing T, Grosse R. (2011). Nucleating actin for invasion. *Nat Rev Cancer*.

Nyholm TK, Ozdirekcan S, Killian JA. (2007). How protein transmembrane segments sense the lipid environment. *Biochemistry*.

O

Odde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. (2009). Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim Biophys Acta*

Odorizzi G. (2006). The multiple personalities of Alix. *J. Cell. Sci*

Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *The Journal of cell biology*

Orth JD, Krueger EW, Weller SG, McNiven MA. (2006). A novel endocytic mechanism of epidermal growth factor receptor sequestration and internalization. *Cancer Res*

P

Palade GE. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol*

Palade, GE. (1953). Fine Structure of Blood Capillaries. *J. Appl. Phys.*

Pan J, Tristram-Nagle S, Nagle JF. (2009). Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation. *Phys Rev E* 80: 021931

Pan, S., R. Wang, X. Zhou, J. Corvera, M. Kloc, R. Sifers, G.E. Gallick, S.H. Lin, and J. Kuang. 2008. Extracellular Alix regulates integrin-mediated cell adhesions and extracellular matrix assembly. *Embo J*

- Pan, S., Wang, R., Zhou, X., He, G., Koomen, J., Kobayashi, R., Sun, L., Corvera, J., Gallick, G. E. and Kuang, J. (2006). Involvement of the conserved adaptor protein Alix in actin cytoskeleton assembly. *J Biol Chem*
- Parachoniak CA, Park M.. (2012). Dynamics of receptor trafficking in tumorigenicity. *Trends Cell Biol*
- Parton RG, del Pozo MA. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*
- Parton RG, Joggerst B, Simons K. (1994). Regulated internalization of caveolae. *The Journal of cell biology*
- Pasqual, G, Rojek JM, Masin M, Chatton JY, Kunz S. (2011). Old world arenaviruses enter the host cell via the multivesicular body and depend on the endosomal sorting complex required for transport. *PLoS Pathog*
- Patel PC, Harrison RE. (2008). Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. *Molecular biology of the cell*
- Payne CK, Jones SA, Chen C, Zhuang X. (2007). Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. *Traffic*
- Pelkmans L, Zerial M. (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*
- Pelkmans, L., and Helenius, A. (2003) Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 15: 414–422.
- Perera R.M, Zoncu R, Lucast L, DeCamilli P. Toomre D. (2006) Two synaptojanin 1Isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proc.Natl Acad.Sci.*
- Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH. (1999). Mutagenesis identifies new signals for b-amyloid precursor protein endocytosis ,turnover, and the generation of secreted fragments, including Ab42. *JBiolChem*
- Perry MM, Gilbert AB. (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*
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*
- Petiot A, Fauré J, Stenmark H, Gruenberg J. (2003). PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *J.Cell.Biol*
- Petiot A, Strappazon F, Chatellard-Causse C, Blot B, Torch S, Verna JM, Sadoul R. (2008). Alix differs from ESCRT proteins in the control of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*
- Petrelli, A., G.F. Gilestro, S. Lanzardo, P.M. Comoglio, N. Migone, and S. Giordano. (2002). The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*
- Pires, R., B. Hartlieb, L. Signor, G. Schoehn, S. Lata, M. Roessle, C. Moriscot, S. Popov, A. Hinz, M. Jamin, V. Boyer, R. Sadoul, E. Forest, D.I. Svergun, H.G. Gottlinger, and W. Weissenhorn. (2009). A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure*.
- Pollard TD. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*

Predescu SA, Predescu DN, Knezevic I, Klein IK, Malik AB. (2007). Intersectin-1s regulates the mitochondrial apoptotic pathway in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*

Prigent M, Dubois T, Raposo G, Derrien V, Tenza D, Rossé C, Camonis J, Chavrier P. (2003). ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J Cell Biol*

Pucadyil TJ, Schmid SL. (2008). Real-time visualization of dynamin-catalyzed membrane fission and vesicle release. *Cell*

Q

Qualmann B, Kelly RB. (2000). Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *The Journal of cell biology*

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

Qualmann B, Roos J, DiGregorio PJ, Kelly RB. (1999). Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Molecular biology of the cell*

R

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

Randazzo, P. A. and Hirsch, D. S. (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cell. Signal*

Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D, Evans E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *BiophysJ* 79: 328–339.

Reider A, Barker SL, Mishra SK, Im YJ, Maldonado-Baez L, Hurley JH, Traub LM, Wendland B. (2009). Syt1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *The EMBO journal*

Renard, H., M. Simunovic, J. Lemiere, E. Boucrot, M.D. Garcia-Castillo, S. Arumugam, V. Chambon, C. Lamaze, C. Wunder, A.K. Kenworthy, A.A. Schmidt, H.T. McMahon, C. Sykes, P. Bassereau, and L. Johannes. (2014). Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature*.

Ringstad N, Nemoto Y, DeCamilli 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*.

Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*

Robens JM, Yeow-Fong L, Ng E, Hall C, Manser E. (2010). Regulation of IRSp53-dependent filopodial dynamics by antagonism between 14-3-3 binding and SH3-mediated localization. *Molecular and cellular biology*

Rollinson S, Rizzu P, Sikkink S, Baker M, Halliwell N, Snowden J, Traynor BJ, Ruano D, Cairns N, Rohrer JD, Mead S, Collinge J, Rossor M, Akay E, Guerreiro R, Rademakers R, Morrison KE, Pastor P, Alonso E, Martinez-Lage P, Graff-Radford N, Neary D, Heutink P, Mann DM, Van Swieten J,

- Pickering-Brown SM. (2009). Ubiquitin associated protein 1 is a risk factor for frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiol Aging*.
- Romer W, Berland L, Chambon V, Gaus K, Windschiegel B, Tenza D, Aly MR, Fraissier V, Florent J-C, Perrais D, et al. (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 450: 670–675.
- Römer W, Pontani LL, Sorre B, Rentero C, Berland L, Chambon V, Lamaze C, Bassereau P, Sykes C, Gaus K, Johannes L. (2010). Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis. *Cell*.
- Rosenthal JA, Chen H, Slepnev VI, Pellegrini L, Salcini AE, Di Fiore PP, De Camilli P. (1999). The epsins define a family of proteins that interact with components of the clathrin coat and contain a new protein module. *The Journal of biological chemistry*
- Rossman JS, Lamb RA. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411: 229–236.
- Rothman JH, Stevens TH. (1986). Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell*
- Roux A, Cappello G, Cartaud J, Prost J, Goud B, Bassereau P. (2002). A minimal system allowing tabulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc Natl Acad Sci* 99: 5394–5399.
- Roux A, Cuvelier D, Nassoy P, Prost J, Bassereau P, Goud B. (2005). Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBOJ* 24:1537–1545
- Rusten TE, Filimonenko M, Rodahl LM, Stenmark H, Simonsen A. (2007). ESCRTing autophagic clearance of aggregating proteins. *Autophagy*

S

- Saarikangas J, Zhao H, Pykalainen A, Laurinmaki P, Mattila PK, Kinnunen PK, Butcher SJ, Lappalainen P. (2009). Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Current biology*
- Saavedra L, Mohamed A, Ma V, Kar S, de Chaves EP. (2007). Internalization of beta-amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E. *J Biol Chem*
- Sabharanjak S, Sharma P, Parton RG, Mayor S. (2002). GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Developmental cell*
- Sadoul, R. (2006). Do Alix and ALG-2 really control endosomes for better or for worse. *Bio. Cell*.
- Saksena S, Emr SD. (2009). ESCRTs and human disease. *Biochem Soc Trans*
- Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD. (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*
- Sarasij RC, Mayor S, Rao M. 2007. Chirality induced budding: a raft-mediated mechanism for endocytosis and morphology of caveolae? *Biophys.J.*
- Sauvonnet N, Dujeancourt A, Dautry-Varsat A. (2005). Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gamma cytokine receptor. *The Journal of cell biology*
- Schafer DA (2004) Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic*

- Scheffer, L.L., S.C. Sreetama, N. Sharma, S. Medikayala, K.J. Brown, A. Defour, and J.K. Jaiswal. 2014. Mechanism of Ca(2+)-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature communications*
- Schmid EM, McMahon HT. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature*
- Schmidt A. (2002). Rôle de la modification des lipides dans la biogénèse des vésicules et la fission. *Médecine Sciences*
- Schmidt O, Teis D. (2012). The ESCRT machinery. *Curr Biol*
- Schmidt, M. H., Chen, B., Randazzo, L. M. and Bogler, O. (2003). SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *J Cell Sci*
- Schmidt, M. H., Dikic, I. and Bogler, O. (2005). Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *J Biol Chem*
- Schmidt, M. H., Hoeller, D., Yu, J., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., Dikic, I. and Bogler, O. (2004). Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Mol Cell Biol*
- Schneider A, Rajendran L, Honsho M, Gralle M, Donnert G, Wouters F, Hell SW, Simons M. (2008). Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*
- Schwedler U, Stray K, Garrus J, Sundquist W. (2003). Functional Surfaces of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein. *J Virol*
- Schweitzer JK, Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. (2011). ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. *Semin Cell Dev Biol*
- Scott C, Vacca F, Gruenberg J. (2014). Endosome maturation, transport and functions. *Sem Cell Dev Biol*
- Sharma P, Varma R, Sarasij RC, Ira, Gousset K, Krishna-Moorthy G, Rao M, Mayor S. (2004). Nano scale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell*
- Shen L, Turner JR. (2005). Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Molecular biology of the cell*
- Shi Z, Baumgart T. (2015). Membrane tension and peripheral protein density mediate membrane shape transitions. *Nature Comm*
- Shimada A, Niwa H, Tsujita K, Suetsugu S, Nitta K, Hanawa-Suetsugu K, Akasaka R, Nishino Y, Toyama M, Chen L, Liu ZJ, Wang BC, Yamamoto M, Terada T, Miyazawa A, Tanaka A, Sugano S, Shirouzu M, Nagayama K, Takenawa T, Yokoyama S. (2007). Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell*
- Shirk AJ, Anderson SK, Hashemi SH, Chance PF, Bennett CL. (2005). SIMPLE interacts with NEDD4 and TSG101: evidence for a role in lysosomal sorting and implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurosci Res*
- Sigismund S, Algisi V, Nappo G, Conte A, Pascolutti R, Cuomo A, Bonaldi T, Argenzio E, Verhoef LG, Maspero E, Bianchi F, Capuani F, Ciliberto A, Polo S, Di Fiore PP. (2013). Threshold-controlled ubiquitination of the EGFR directs receptor fate. *EMBO J*

- Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Di Fiore PP. (2008). Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Developmental cell*
- Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Di Fiore PP, Polo S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *PNAS*
- Sinha B, Koster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, Stan RV, Butler-Browne G, Vedie B, Johannes L, Morone N, Parton RG, Raposo G, Sens P, Lamaze C, Nassoy P. (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*
- Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sorensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet*
- Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*
- Sorre B, Callan-Jones A, Manzi J, Goud B, Prost J, Bassereau, Roux A. (2012). Nature of curvature coupling of amphiphysin with membranes depends on its bound density. *PNAS*
- Sotelo JR, Porter KR. (1959). An electron microscope study of the rat ovum. *J Biophys Biochem Cytol.*
- Soubeyran, P., K. Kowanetz, I. Szymkiewicz, W.Y. Langdon, and I. Dikic. (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*
- Springael, J. Y., Nikko, E., Andre, B. and Marini, A. M. (2002). Yeast Npi3/Bro1 is involved in ubiquitindependent control of permease trafficking. *FEBS Lett*
- Stachowiak JC, Hayden CC, Sasaki DY. (2010). Steric confinement of proteins on lipid membranes can drive curvature and tubulation. *Proc Natl Acad Sci* 107: 7781–7786.
- Stachowiak JC, Schmid EM, Ryan CJ, Ann HS, Sasaki DY, Sherman MB, Geissler PL, Fletcher DA, Hayden CC. (2012). Membrane bending by protein-protein crowding. *Nature cell biology* 14: 944-949
- Štefl M¹, Šachl R, Humpolíčková J, Cebecauer M, Macháň R, Kolářová M, Johansson LB, Hof M.(2012).Dynamics and size of cross-linking-induced lipid nanodomains in model membranes. *Biophys J*
- Stoeber M, Stoeck IK, Hanni C, Bleck CK, Balistreri G, Helenius A. (2012). Oligomers of the ATPase EHD2 confine caveolae to the plasma membrane through association with actin. *The EMBO journal*
- Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H.G. Gottlinger. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*
- Stuffers S, Brech A, Stenmark H. (2009). ESCRT proteins in physiology and disease. *Experimental cell research*
- Suarez A, Ueno T, Huebner R, McCaffery JM, Inoue T. (2014). Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) family members bend membranes in cells. *Sci.report*
- Subtil A, Delepierre M, Dautry-Varsat A. (1997). An alpha-helical signal in the cytosolic domain of the interleukin 2 receptor beta chain mediates sorting towards degradation after endocytosis. *The Journal of cell biology*

- Subtil A, Hemar A, Dautry-Varsat A. (1994). Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *Journal of cell science*
- Suetsugu S, Gautreau A (2012) Synergistic BAR-NPF interactions in actin-driven membrane remodeling. *Trends in cell biology* 22: 141-150
- Suetsugu S, Murayama K, Sakamoto A, Hanawa-Suetsugu K, Seto A, Oikawa T, Mishima C, Shirouzu M, Takenawa T, Yokoyama S (2006) The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *The Journal of biological chemistry* 281: 35347-35358
- Suetsugu S, Toyooka K, Senju Y. (2010). Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 340-349
- Suetsugu S, Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. (2003). Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Developmental cell*
- Sun S, Zhou X, Zhang W, Gallick GE, Kuang J. (2014). Unravelling the pivotal role of Alix in MVB sorting and silencing of the activated EGFR. *Biochem J*
- Suzuki KG, Kasai RS, Hirosawa KM, Nemoto YL, Ishibashi M, Miwa Y, Fujiwara TK, Kusumi A. (2012). Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nat Chem Biol.*
- Swanson JA. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nature reviews Molecular cell biology*
- Szymkiewicz, I., Kowanetz, K., Soubeyran, P., Dinarina, A., Lipkowitz, S. and Dikic, I. (2002). CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*

T

- Takei K, McPherson PS, Schmid SL, De Camilli P (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature*
- Tanikawa S, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. (2012). Endosomal sorting related protein CHMP2B is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusion in α -synucleinopathy. *Neurosci Letter*
- Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ. (2011). A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS biology*
- Thien CB, Walker F, Langdon WY. (2001). RING finger mutations that abolish c-Cbl-directed polyubiquitination and downregulation of the EGF receptor are insufficient for cell transformation. *Mol Cell*
- Thien, C. B. and Langdon, W. Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*
- Timpson P, Lynch DK, Schramek D, Walker F, Daly RJ. (2005). Cortactin overexpression inhibits ligand-induced down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*
- Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K. (2001). Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J. Cell Sci.*
- Traub LM. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature reviews Molecular cell biology*

Trioulrier, Y., Torch, S., Blot, B., Cristina, N., Chatellard-Causse, C., Verna, J. M. and Sadoul, R. (2004). Alix, a protein regulating endosomal trafficking, is involved in neuronal death. *J Biol Chem*

U

Underhill D, Goodridge H. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Imm*

Ungewickell E, and Branton D. (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature*

Urbé S. (2005). Ubiquitin and endocytic protein sorting. *Essays Biochem.*

V

Vaccari T, Bilder D. (2005). The Drosophila tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev Cell*

Verstreken P, Kjaerulff O, Lloyd TE, Atkinson R, Zhou Y, Meinertzhagen IA, Bellen HJ. (2002). Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell*

Vito, P., Lacana, E. and D'Adamio, L. (1996). Interfering with apoptosis: Ca(2+)-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science*

Vito, P., Pellegrini, L., Guet, C. and D'Adamio, L. (1999). Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a Ca2+-dependent reaction. *J Biol Chem*

Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. (2012). Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*

von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D. M., Chung, H. Y., Morita, E., Wang, H. E., Davis, T., He, G. P., Cimbara, D. M. et al. (2003). The protein network of HIV budding. *Cell*

W

Wandinger-Ness A, Zerial M. (2014). Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb*

Wang SF, Tsao CH, Lin YT, Hsu DK, Chiang ML, Lo CH, Chien FC, Chen P, Arthur Chen YM, Chen HY, Liu FT. (2014). Galectin-3 promotes HIV-1 budding via association with Alix and Gag p6. *Glycobiology*.

Watanabe S, Rost BR, Camacho-Pérez M, Davis MW, Söhl-Kielczynski B, Rosenmund C, Jorgensen EM. (2013). Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature*.

Watanabe, S., T. Trimbuch, M. Camacho-Perez, B.R. Rost, B. Brokowski, B. Sohl-Kielczynski, A. Felies, M.W. Davis, C. Rosenmund, and E.M. Jorgensen. 2014. Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature*

Weaver AM, Heuser JE, Karginov AV, Lee WL, Parsons JT, Cooper JA. (2002). Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. *Current biology*

White, I.J., Bailey, L.M., Aghakhani, M.R., Moss, S.E. and Futter, C.E. (2006). EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *Embo J*

Wiley HS, Herbst JJ, Walsh BJ, Lauffenburger DA, Rosenfeld MG, Gill GN. (1991). The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry*

Wiley HS. (1988). Anomalous binding of epidermal growth factor to A431 cells is due to the effect of high receptor densities and a saturable endocytic system. *The Journal of cell biology*

Woelk T, Sigismund S, Penengo L, Polo S. (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Division*

Woelk T, Sigismund S, Penengo L, Polo S. (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div*

Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*

Woodman P. (2009). ESCRT proteins, endosome organization and mitogenic receptor down-regulation. *Biochem Soc Trans*

Wu Y, O'Toole ET, Girard M, Ritter B, Messa M, Liu X, McPherson PS, Ferguson SM, De Camilli P. (2014). A dynamin 1-, dynamin 3- and clathrin-independent pathway of synaptic vesicle recycling mediated by bulk endocytosis. *Elife*

Wu, Y., Pan, S., Che, S., He, G., Nelman-Gonzalez, M., Weil, M. M. and Kuang, J. (2001). Overexpression of Hp95 induces G1 phase arrest in confluent HeLa cells. *Differentiation*

Wu, Y., Pan, S., Luo, W., Lin, S. H. and Kuang, J. (2002). Hp95 promotes anoikis and inhibits tumorigenicity of HeLa cells. *Oncogene*

X

Xing Y, Bocking T, Wolf M, Grigorie ffN, Kirchhausen T, Harrison SC. (2010). Structure of clathrine coat with bound Hsc70 and auxilin: Mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBOJ*

Y

Yarar D, Waterman-Storer CM, Schmid SL. (2007). SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Developmental cell*

Z

Zhang J, Fan J, Tian Q, Song Z, Zhang JF, Chen Y. (2012). Characterization of two distinct modes of endophilin in clathrin-mediated endocytosis. *Cellular signalling*

Zhang Q, Nowak I, Vonderheid EC, Rook AH, Kadin ME, Nowell PC, Shaw LM, Wasik MA. (1996). Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *PNAS*

Zhou X., Si J., Corvera J., Gallick G. E., Kuang J. 2010. Decoding the intrinsic mechanism that prohibits ALIX interaction with ESCRT and viral proteins. *Biochem. J*

Résumé

L'endocytose est le processus qui permet l'entrée, dans la cellule, de portions de la membrane plasmique ainsi que du milieu extracellulaire et des substances qu'il contient. Ces dernières années, plusieurs mécanismes d'endocytose ont été identifiés, mais la voie médiée par la clathrine (CME) reste la mieux caractérisée à l'heure actuelle. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à Alix, une protéine adaptatrice qui s'associe avec de nombreux partenaires de la voie endolysosomale mais dont le rôle dans l'endocytose reste encore peu connu. **Ce travail de recherche a pour objectif de mieux comprendre le rôle d'Alix dans l'endocytose, grâce notamment à l'utilisation de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) ko pour la protéine Alix.** Au cours de ce travail, nous avons montré que l'endocytose indépendante de la clathrine (CIE) est inhibée dans les cellules ko Alix, alors que la CME demeure intacte. En effet, l'internalisation de plusieurs cargos empruntant la CIE est affectée par la déplétion d'Alix alors que des cargos entrant par CME sont endocytés normalement dans les cellules ko Alix. La CIE peut être restaurée par l'expression d'Alix sauvage dans les MEF ko Alix, mais pas par un mutant d'Alix incapable d'interagir avec les endophilines A, protéines qui ont récemment été décrites comme contrôlant une voie CIE. De plus, la déplétion de l'endophiline A2 dans les MEF ko Alix n'a aucun effet sur la CIE. Nos résultats indiquent donc qu'Alix et les endophilines A agissent de concert dans le contrôle de la CIE. Enfin, en accord avec une inhibition de la CIE, nous montrons que la migration des MEF ko Alix (qui dépend notamment de la CIE de l'intégrine $\beta 1$) est ralentie et que la signalisation induite par l'IL2R, un cargo CIE, est perturbée. Ces données démontrent donc pour la première fois que la protéine Alix, en partenariat avec les endophilines, contrôle spécifiquement la CIE et que l'inhibition de cette fonction d'Alix affecte la physiologie cellulaire.

Abstract

Endocytosis is the process permitting entry to the cell of portions of membrane as well as of extracellular milieu and the substances it contains. In recent years, several endocytic mechanisms have been identified but clathrin-mediated endocytosis (CME) is the best characterised so far. In the present work, we have been interested in Alix, an adaptor protein which associates with numerous partners involved in the endolysosomal pathway, although its exact role in endocytosis remains poorly understood. **The goal of this research was to better understand Alix role in endocytosis using Alix ko Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs).** Using this model, we show that Clathrin Independent Endocytosis (CIE) is impaired in these cells while Clathrin Mediated Endocytosis (CME) is unaffected. Indeed, CIE cargo internalization is disrupted by Alix depletion while CME cargoes are endocytosed normally in Alix ko cells. CIE in Alix ko MEFs can be restored by wild-type Alix expression but not by an Alix mutant deleted of its interaction site with endophilin A, proteins recently identified as involved in the control of a CIE. Moreover, endophilin A2 depletion has no effect in Alix ko MEFs. Our results thus indicate that Alix and endophilin A2 act together in the control of CIE. Finally, in agreement with a role of Alix in CIE inhibition, we show that Alix ko MEF migration (depending on CIE of β -integrin) is slower and that IL2R- (a CIE cargo) induced signalling is impaired in the absence of Alix. Our results demonstrate, for the first time, that Alix, together with endophilins, specifically controls CIE and that inhibition of this function of Alix affects cell physiology.