



Le rôle des protéines courbant les membranes dans l'endocytose indépendante de la clathrine suivie par le récepteur de l'interleukine 2

Laëtitia Bertot

► To cite this version:

Laëtitia Bertot. Le rôle des protéines courbant les membranes dans l'endocytose indépendante de la clathrine suivie par le récepteur de l'interleukine 2. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2016. Français. NNT : 2016SACLS570 . tel-01988742

HAL Id: tel-01988742

<https://theses.hal.science/tel-01988742>

Submitted on 22 Jan 2019

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.

NNT : 2016SACLS570

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N° 577
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Par

Mme Laetitia Bertot

Le rôle des protéines courbant les membranes dans l'endocytose indépendante de la clathrine suivie par le récepteur de l'interleukine 2

Thèse soutenue à l'Institut Pasteur - salle Jules Bordet, le 15 décembre 2016 :

Composition du Jury :

Mr CAPY Pierre
Mme HIVROZ Claire
Mme THOULOZE Maria-Isabel
Mr MONTAGNAC Guillaume
Mr DELEVOYE Cédric
Mme SAUVONNET Nathalie

Professeur, Université Paris-Saclay
Directrice de recherche, Institut Curie
Directrice de recherche, Institut Pasteur
Chargé de recherche, Institut Gustave Roussy
Chargé de recherche, Institut Curie
Directrice de recherche, Institut Pasteur

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Table des matières

Table des figures et des tableaux :	9
Remerciements	12
Liste des abréviations	13
Préambule :	20
Introduction :	22
I. Les facteurs courbant les membranes	22
A. Les protéines à domaine directement impliqué dans les courbures	22
i. La superfamille des protéines de type ANTH / ENTH	22
a. Présentation	22
1. Le domaine ENTH	22
2. Le domaine ANTH	23
b. Différences structurales	25
c. Mode d'action	26
ii. La superfamille des protéines possédant un domaine BAR	27
a. Présentation	27
b. Les différentes classes	28
1. Les courbures de forte intensité	28
➤ BAR classique	28
➤ N-BAR	28
➤ BAR-PH	30
➤ PX-BAR	30
2. Les courbures de faible intensité	31
➤ F-BAR	31

3.	Les courbures inverses	32
➤	I-BAR.....	32
c.	Synthèse et différences des protéines à domaine BAR	34
iii.	Les protéines de type ALPS	34
a.	Présentation	34
b.	Particularités des motifs ALPS	35
c.	Mode d'action.....	35
B.	Les autres facteurs courbant les membranes	36
i.	Les manteaux.....	36
a.	Le manteau à clathrine	38
b.	Le manteau COP I et COP II.....	40
1.	Le rôle des protéines ALPS dans la formation du manteau	40
2.	La composition du manteau COP I	40
3.	La composition du manteau COP II.....	42
c.	Le manteau des cavéoles	42
1.	L'importance de la cavéoline	42
2.	L'importance des cavines.....	43
3.	La structure du manteau des cavéoles.....	45
ii.	Les modifications lipidiques	45
a.	La bicouche lipidique	48
b.	Microdomaine – notion de radeaux lipidiques	48
c.	Les feuilletts	52
d.	Composition des membranes des organelles.....	52
e.	Structure biophysique des lipides dans les membranes.....	53

f. Action des modifications lipidiques sur les courbures des membranes.....	53
1. Phospholipases A, B, C, D.....	55
➤ L'exemple de la phospholipase D : structure et activité	55
➤ L'importance de l'acide phosphatidique dans la courbure membranaire.....	56
2. Flippase, floppase, scramblase.....	58
iii. Le cytosquelette d'actine.....	60
➤ L'actine câblée	61
➤ L'actine branchée	61
➤ Les facteurs régulant la polymérisation de l'actine	63
iv. Les dynamines.....	65
➤ Structure de la dynamine.....	65
➤ Les différentes isoformes de la dynamine.....	65
➤ Reconnaissance des courbures par la dynamine	65
➤ Importance de l'activité GTPase.....	66
➤ Oligomérisation de la dynamine	66
➤ Aspect moléculaire.....	68
II. Rôles des protéines courbant les membranes dans les voies d'endocytose	72
A. Les voies d'endocytose produisant des vésicules de grandes tailles.....	74
i. La macropinocytose	74
a. Présentation	74
b. Les facteurs impliqués dans la courbure de la membrane.....	74
1. Les sorting nexines.....	74
2. L'actine	74

3. La protéine CtBP1/BARS	75
ii. La phagocytose.....	75
a. Présentation	75
b. Les facteurs impliqués dans la courbure de la membrane.....	75
1. FBP17, une protéine F-BAR.....	75
2. Les lipides	76
B. Les voies d'endocytose produisant des vésicules de petites tailles avec manteau.....	76
i. La voie clathrine.....	76
a. Présentation	77
b. Les facteurs impliqués dans la courbure de la membrane.....	77
1. Rôle des phospholipides de la membrane plasmique.....	77
2. Les protéines à domaine BAR, ANTH et ENTH.....	77
3. L'actine	80
4. La dynamine.....	80
5. La synaptojanine	81
6. Forces exercées par le regroupement local des récepteurs.....	81
7. Rôle coopératif de ces protéines dans la scission de la vésicule.....	82
➤ Lien entre l'endophiline et la dynamine	82
➤ Lien entre la dynamine, l'endophiline et l'actine.....	84
➤ Lien entre SNX9, dynamine et actine	85
ii. La voie cavéoline	86
a. Présentation	86
1. Deux degrés de mobilité des cavéoles dans les cellules	86
2. Les facteurs conduisant à la mobilité des cavéoles.....	87

b.	Les facteurs impliqués dans la courbure de la membrane.....	88
1.	La dynamine et ces partenaires	88
2.	La protéine « Epsin homology domain 2 » EHD2.....	88
C.	Les voies d'endocytose produisant des vésicules de petites tailles sans manteau.....	89
i.	La voie CLIC / GEEC	89
a.	Définition.....	89
1.	Les marqueurs de ce mécanisme.....	89
2.	L'aspect des vésicules	90
b.	Les protéines courbant les membranes.....	90
1.	Le regroupement local de la galectine 3	90
2.	La controverse sur l'implication de la dynamine.....	91
3.	L'actine	93
4.	Les protéines à domaine BAR	93
ii.	La voie des cytokines suivie par le récepteur de l'interleukine 2	94
a.	La physiologie du récepteur de l'interleukine 2	94
1.	Composition du récepteur	94
2.	Importance du récepteur dans la réponse immunitaire	95
3.	La transmission du signal par les récepteurs de cytokines.....	95
4.	La cascade de signalisation induite par l'IL-2	96
a.	L'endocytose des récepteurs de cytokines	98
1.	Les signaux d'endocytose et ceux de tri vers la dégradation.....	98
2.	L'endocytose constitutive des chaînes β et γ	99
3.	La voie induite par le ligand IL-2	101

4. Le devenir du récepteur après internalisation : les différents compartiments cellulaires contenant l'IL-2R et la cinétique d'internalisation de l'IL-2R.....	101
5. Les facteurs identifiés dans la voie d'endocytose de l'IL-2R.....	102
➤ L'actine et ses régulateurs.....	102
➤ Quelques singularités de la voie d'endocytose de l'IL-2R	104
– L'importance des radeaux lipidiques dans la voie de l'IL-2R	104
– Le rôle pivot de la dynamine.....	104
– Le lien entre endocytose et cascade de signalisation	105
– Comparaison avec la voie médiée par la clathrine	105
– Comparaison avec la macropinocytose	106
iii. Objectif de la thèse	108
Résultats.....	112
I. Vérification de l'implication des protéines candidates issue du crible dans l'endocytose suivie par L'IL-2R.....	112
A. Matériel et Méthodes.....	112
i. Cellules, anticorps, plasmides, siRNAs et réactifs.....	112
ii. Transfection de siRNAs dans les cellules Hep2β.....	115
iii. Endocytose par immunofluorescence.....	116
iv. Expression des récepteurs à la surface par cytométrie en flux.....	116
v. Expression des protéines par western blot	117
vi. Imagerie.....	117
1. Microscopie à épifluorescence.....	117
2. Microscopie à onde évanescente (TIRF)	118
3. Quantification des images par le logiciel : ICY	118

B. Résultats	119
i. L'ubiquitine ligase CBL.....	119
ii. La béta arrestine 1	122
iii. La phospholipase D1 et l'activité catalytique des phospholipases D.....	123
iv. L'endophiline A1, A2 et B2	128
a. Importance de l'endophiline A1, A2 et B2 dans la voie constitutive.....	128
– L'endophiline A1	128
– L'endophiline B2.....	131
– L'endophiline A2	132
b. Importance de l'endophiline A2 dans la voie induite.....	134
1. Résumé de l'article :	134
2. Résultats complémentaires :.....	136
II. Rôle de l'endophiline A2 dans l'endocytose suivie par les récepteurs de cytokines.....	137
1. Résumé général :.....	138
2. Détail sur l'article #2.....	139
➤ Production de cellules Hep2β EndoA2-GFP ^{EN}	139
➤ Identification de la population active de l'IL-2R et de la clathrine .	143
➤ Recrutement de l'endophiline et de la dynamine au cours de l'endocytose constitutive de l'IL-2R.....	145
3. Conclusion et perspectives :	147
<i>Discussion & perspectives.....</i>	149
I. L'endophiline et la dynamine dans l'endocytose constitutive de l'IL-2R et dans l'endocytose dépendante de la clathrine.....	149

II. Comparaison entre la voie FEME et celle suivie par l'IL-2R.....	150
III. Le rôle potentiel des protéines confirmées au cours de cette étude	153
i. Les endophilines.....	153
ii. Rôle de la phosphorylation de l'endophiline A1 et A2 dans l'endocytose de l'IL-2R ?	154
iii. La phospholipase D1	156
iv. L'ubiquitine ligase CBL.....	157
v. L'arrestine bêta 1	158
<i>Références bibliographiques.....</i>	161
<i>Annexes.....</i>	176

Table des figures et des tableaux :

Tableau 1 : Les 64 candidats identifiés par le crible siRNA réalisé par Cyril Basquin.....	109
Tableau 2 : Les anticorps utilisés pour les westerns blots	113
Tableau 3 : Les siRNA utilisés pour cette étude (provenant tous de Dharmacon).....	115
Tableau 4 : Tableau récapitulatif sur les protéines impliquées dans cette étude dans les voies d'endocytose (CME, constitutive de l'IL-2R, FEME).....	159
Figure 1 : La courbure des membranes par les protéines à domaine ENTH et ANTH.....	24
Figure 2 : Les protéines courbant les membranes de la famille des protéines à domaine BAR	29
Figure 3 : Les différents manteaux identifiés chez les mammifères et leur localisation.....	37
Figure 4 : Le triskèle et l'assemblage du manteau à clathrine	39
Figure 5 : Le manteau COP I et le fonctionnement de la protéine ARFGAP1	41
Figure 6 : Le manteau COP II formé à partir de la protéine SAR1	41
Figure 7 : L'insertion de la cavéoline dans la membrane et les protéines impliquées dans le manteau des cavéoles	44
Figure 8 : Les trois familles de lipides constituant la membrane chez les mammifères	47
Figure 9 : L'évolution de la vision de la membrane plasmique au cours du XXème siècle ...	49
Figure 10 : Les radeaux lipidiques et leur potentiel rôle dans la formation des vésicules d'endocytose.....	51
Figure 11 : Composition des membranes de la cellule chez les mammifères.....	54
Figure 12 : Modèles de la formation de vésicule par l'accumulation locale d'acide phosphatidique	57
Figure 13 : Mode d'action des flippases, floppases et scramblases.....	59

Figure 14 : La formation des filaments d'actine	62
Figure 15: Formation de l'actine câblée	62
Figure 16: Les deux familles de "nucleation promoting factor" (NPF)	64
Figure 17: Formation de l'actine branchée par Arp2/3	64
Figure 18: Structure de la dynamine 2	67
Figure 19: Oligomérisation de la dynamine 2 pour former une structure en hélice	67
Figure 20 : Les différents types de courbures permettant la formation de la vésicule d'endocytose	69
Figure 21 : Les protéines pouvant conduire à la formation d'une hélice.....	69
Figure 22 : Interaction de l'endophiline A2 avec la dynamine 2	71
Figure 23 : Proposition d'action coopérative entre les différentes protéines impliquées dans la courbure membranaire.....	71
Figure 24 : Les différentes voies d'endocytose	73
Figure 25: Le recrutement des protéines à domaine BAR dans la voie dépendante de la clathrine	79
Figure 26 : le recrutement des protéines courbant les membranes dans la formation des vésicules à manteau clathrine.....	79
Figure 27: Illustration de l'effet des encombrements stériques sur la courbure des membranes	83
Figure 28 : Les courbures membranaires liées à la formation de "cluster" de galectine 3	92
Figure 29 : La cascade de signalisation de l'IL-2R.....	97
Figure 30 : L'endocytose constitutive et induite suivie par l'IL-2R	100
Figure 31 : Régulation de l'actine dans la voie dépendante de la clathrine et celle suivie par l'IL-2R	107
Figure 32 : Rôles potentiels de l'endophiline dans la voie d'endocytose de l'IL-2R.....	111

Figure 33 : c-CBL et la β -arrestine 1 sont impliquées dans l'endocytose de l'IL-2R.....	121
Figure 34 : PLD1 est impliquée spécifiquement dans l'endocytose de l'IL-2R	124
Figure 35 : Importance de l'activité catalytique de la phospholipase D dans l'endocytose de l'IL-2R	126
Figure 36 : Difficultés d'observation de l'acide phosphatidique dans les cellules Hep2 β	127
Figure 37 : L'endophiline A1 et B2 sont impliquées dans l'endocytose de l'IL-2R.....	130
Figure 38 : L'endophiline A2 est impliquées dans l'endocytose de l'IL-2R.....	133
Figure 39 : Les récepteurs empruntant la voie FEME	135
Figure 40: L'importance de l'endophiline dans l'endocytose induite de l'IL-2R.....	135
Figure 41 : Particularités des cellules Endophiline A2 génome éditées	141
Figure 42: Protocole d'analyse des films acquis au TIRF	144
Figure 43 : Schéma résumant les effets de l'absence de l'endophiline A2 ou de la dynamine au cours de l'endocytose de l'IL-2R	146
Figure 44 : Schéma récapitulatif du recrutement de l'endophiline et de la dynamine de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et celle suivie par l'IL-2R.....	148
Figure 45 : Schéma comparatif entre la voie dépendante de la clathrine et la voie FEME...	152
Figure 46 : Différences entre les vésicules formées dans la voie dépendante de la clathrine par rapport à la voie FEME et à l'endocytose constitutive de l'IL-2R.....	152
Figure 47 : Rôles putatifs de la phosphorylation/déphosphorylation des endophilines dans les voies d'endocytose.....	155

Remerciements

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant ma thèse, en particulier, ma directrice de thèse Nathalie Sauvonnet, pour m'avoir fait confiance.

Je remercie les deux unités de recherche où mon doctorat s'est déroulé, l'unité dirigée par le

Pr. Alice Dautry puis l'unité dirigée par le Pr. Philippe Sansonetti pour leur accueil.

Je remercie les « petites mains » qui m'ont formé lors de mon arrivée dans le laboratoire et qui m'ont appris tout de suite d'acquérir les bons gestes lors des expériences.

Merci à tout ceux qui, par un sourire, un mot, un sms, m'ont soutenu durant ma thèse et l'écriture de ce manuscrit.

Dans la nature comme dans la recherche, les choses prennent le temps qu'elles doivent prendre mais j'espère avoir pu apporter ma contribution à l'édifice. Je remercie les collaborations mises en place pendant ma thèse qui m'ont permise d'avancer dans mes travaux de recherche et de produire ce manuscrit.

C'est avec tous ces souvenirs et plein d'autres encore que je vous souhaite une bonne lecture de ce manuscrit.

Liste des abréviations

A

Abi : « Abl-Interactor »

ALPS : « Amphipathic (ou ArfGAP1) lipid-packing sensor »

ANTH : « AP180 NH2-terminal homology »

AP-2 : « Adaptor protein 2 »

AP-180 : « Adaptor protein 180 »

Arf : « ADP-rybosylation factor »

ArfGAP1 : « ADP-rybosylation factor GTPase-Activating-Protein 1 »

Arp2/3 : « Actin related protein »

ATP : « Adenosine Triphosphate »

B

BAR : « Bin-Amphiphysin-Rvs »

BSE : « Bundle Signalling Element »

β -COP : β -Coat Protein

C

CALM : « Clathrin-assembly lymphoid myeloid leukemia protein »

CD : Cluster of Differentiation

Cdc42 : « Cell division control protein 42 »

CIN85 : CBL-interacting 85-kDa protein

CLIC : « Clathrin independent carrier »

CME : Endocytose médiée par la clathrine

Ctbp1/BARS : « C-terminal binding protein-1/brefeldinA ADP ribosylated substrate »

CtxB : Sous unité B de la toxine du choléra

D

Dab2 : « Disabled homolog 2 »

DAG : Diacylglycérol

(m-)Dia : « mammalian Diaphanous »

DMEM : Dulbecco Modified Eagle Medium

E

EFCH : Extended Fer-CIP4 Homology

EGF : « Epidermal Growth Factor »

EHD : « Eps-15 homology domain-containing protein »

Enah/Mena : « Enabled homolog (Drosophila) »

ENTH : « Epsin NH2-terminal homology »

EPR : Electron Parametric Resonance

Eps15 : « Epidermal growth factor substrate 15 »

Epsin : « Eps15-interactor »

F

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting

FBP17 : « Formin binding protein 17 »

FCH/FCHO : « Fer Cip4 Homology / FCH domain only »

FcR : « Fragment crystallizable receptor »

FEME : Fast Endophilin Mediated Endocytosis

FH : « Formin homology »

FR : « Folate receptor »

FRAP : Fluorescence Recovery after Photobleaching

FYVE : Fab1, YOTB, vac1, EEA1

G

GDP : Guanosine Diphosphate

GED : GTPase effector Protein

GEEC : « GPI early endosomal compartment »

GEF : GTP Exchange Factor

GFP : « Green fluorescent protein »

GMAP-210 : Golgi-Associated Microtubule-Binding Protein 210

GPCR : « G Protein Coupled Receptor »

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GPI-AP : « Glycosylphosphatidylinositol – Anchored Protein »

GRAF1 : « GTPase regulator associated with FAK »

GSL : Glycosphingolipids

GTP : Guanosine Triphosphate

GUV : « Giant unilamellar vesicle »

H

HCS : High Content Screening

Hip1/Hip1R : « Huntingtin interacting protein 1/Hip1 related protein »

HRP : Horseradish Peroxidase

HS1 : « Haematopoietic lineage cell-specific gene protein 1 »

I

I-BAR : Inverse – Bin/Amphiphysin/Rvs

IgG : Immunoglobuline G

IL-2/IL-2R : Interleukine 2 / « IL-2 receptor »

IMD : IRSp53/MIM Homology Domain

IRSp53 : « Insulin Receptor Substrate p53 »

J

JAK : Janus Kinase

L

LC : Low Complex

LDL/LDLR : « Low Density Lipoprotein / LDL receptor »

LPAAT : Lysophosphatidic acid acyl transferase

M

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MD : Molecular Dynamic

N

Nap : « NCK associated protein »

NBD : Nitrobenzoxadiazole

NPF: « Nucleation promoting factor »

NUP133 : Nucleoporin protein 133

P

PA : Acide Phosphatidique

PACSIN : « PKC and casein kinase substrate in neurons 2 » (synonyme: syndapine)

PAK : « p21-activated kinase »

PC : Phosphatidylcholine

PDGF : « Platelet-derived growth factor »

PH : « Pleckstrin homology »

PI3K : « Phosphoinositide 3-kinase »

PI3P : Phosphatidylinositol-3-monophosphate

PI(4,5)P2 : Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PI(3,4,5)P3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PICALM : Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein

PINKBAR : Planar Intestinal-and Kidney-specific Bin/Amphiphysin/Rvs

PKC : « Protein kinase C »

PLD : Phospholipase D

POPC : «1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine »

PRD: Proline Rich Domain

PS : Phosphatidylsérine

PX-BAR : Phox-Bin/Amphiphysin/Rvs

R

Rac1: « ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 »

RFP : « Red Fluorescence Protein »

S

SCID : Severe Combined Immunodeficiency

SH3 : « Src homology type 3 »

siRNA : Acide RiboNucléique interférant

SNX : « Sorting nexin »

Sos-1 : « Son Of Sevenless homolog 1 »

Sra : « Specific Rac1-Associated Protein »

srGAP : « Slit-Robo GTPase activating protein »

STAT : signal transducers and activators of transcription

SV40 : Simian Virus 40

T

TDK : Triple Knockdown

TEM : Transmission Electron Microscopy

Tf/TfR : Transferrine / « Tf receptor

Tiam1 : « T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein1 » (Tiam1)

TIRF : « Total Internal Reflection Fluorescence »

TTP : « Transferrin Receptor-Trafficking Protein »

V

VASP : « Vasodilator-stimulated phosphoprotein »

W

WASH : « WASP And Scar Homolog »

(N-)WASP : « (Neuronal-) Wiskott-Aldrich syndrome protein »

WAVE : « WASP-family verpolin homologous »

WH2 : « Wiskott-Aldrich homology region 2 »

Préambule :

L'endocytose est un mécanisme essentiel qui permet l'internalisation d'éléments tels que des nutriments. Ce processus physiologique est impliqué dans de nombreuses fonctions comme la nutrition, la migration et la division cellulaire. Les cellules reçoivent en permanence des signaux provenant de leur environnement par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires dont le devenir est l'internalisation dans la cellule.

L'endocytose se déroule au niveau de la membrane plasmique de la cellule. Le processus démarre par l'invagination d'un puits, la formation d'une vésicule qui va se détacher de la membrane pour fusionner avec d'autres compartiments intracellulaires.

L'endocytose peut également être médiée par un récepteur et les vésicules générées peuvent être recouvertes d'un manteau (clathrine, cavéoline) ou non.

L'endocytose peut être constitutive (sans ligand) ou induite (avec ligand). Mon travail de thèse était focalisé sur l'endocytose du récepteur d'une cytokine, l'IL-2R qui peut emprunter ces deux modes d'internalisation. L'induction par le ligand IL-2 génère un signal transmis dans le noyau par des cascades de signalisation, conduisant notamment à la prolifération des cellules. L'endocytose du récepteur à l'IL-2 conduit à sa dégradation permettant l'extinction du signal. L'IL-2 et son récepteur est indispensable à la réponse immunitaire ce qui explique qu'il est hautement régulé. L'induction par l'IL-2 et l'endocytose de son récepteur sont essentiels dans la régulation de la réponse immunitaire et tout déséquilibre conduit à des pathologies (leucémies ou au contraire immunodéficiences).

Ce récepteur emprunte une voie d'endocytose sans manteau encore peu caractérisée au moment de mon arrivée. Notamment, les étapes précoces de l'endocytose de ce récepteur n'étaient pas

connues. Un crible réalisé par Cyril Basquin a permis d'identifier de nouvelles protéines candidates pouvant induire l'invagination de la membrane plasmique.

Le but de ma thèse était de comprendre comment les protéines courbant les membranes intervenaient dans l'endocytose de l'IL-2R. La validation de certaines protéines issues du crible m'a permis d'identifier deux familles de protéines particulièrement intéressantes (les endophilines et les phospholipases D) qui sont capables de détecter, stabiliser ou d'induire les courbures membranaires.

C'est pourquoi dans la première partie de ce manuscrit, je décrirai les différents mécanismes permettant de courber les membranes avant de présenter dans la seconde partie les principales voies d'endocytose, en précisant les facteurs impliqués dans la déformation des membranes.

Introduction :

La déformation des membranes joue un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes physiologiques. Ces déformations se produisent sous l'action de forces s'exerçant directement ou indirectement sur la membrane. Je présenterai, dans un premier temps, les différents moyens utilisés par les cellules eucaryotes pour déformer les membranes. Dans un second temps, je m'intéresserai à l'implication de ces courbures membranaires dans les voies d'endocytose.

I. Les facteurs courbant les membranes

A. Les protéines à domaine directement impliqué dans les courbures

Dans cette partie, je présenterai les domaines et motifs qui jouent un rôle dans la déformation des membranes, je soulignerai les différences entre les familles de domaine. Pour finir, je décrirai leur mode d'action.

i. La superfamille des protéines de type ANTH / ENTH

a. Présentation

1. Le domaine ENTH

L'Epsine est une protéine de type ENTH (Epsin N-Terminal Homology) composée de 576 résidus d'acides aminés. Comme l'indique son nom complet « Eps15-interactor », l'Epsine a été identifiée par son interaction avec la protéine Eps15 (H. Chen et al., 1998). Le groupe de Pier Paolo Di Fiore a nommé ce domaine d'interaction EH pour « Eps15-Homology » (Wong et al., 1995). Cette famille est constituée de cinq isoformes : Epsine 1, 2a, 2b, 3 et R pour « Related protein » (Horvath et al., 2007). Seule l'isoforme R ne possède pas le domaine NPF correspondant aux résidus Asparagine (N)-Proline (P)-Phénylalanine (F). Ce dernier reconnaît le domaine EH de Eps15, il est localisé dans la région C-terminale de l'Epsine (Horvath et al., 2007).

Des études de comparaison de séquences (Figure 1) ont montré que le domaine ENTH, constitué d'une centaine de résidus d'acides aminés et situé dans la région N-terminale, est présent dans tout le règne eucaryote, de la levure à l'homme ((Rosenthal et al., 1999), (Kay et al., 1999), ((Horvath et al., 2007)). Les Epsine 1, 2a, 2b et 3 partagent près de 70% de similarité de séquence dans leur domaine ENTH et seulement 40% avec l'isoforme R (Horvath et al., 2007).

Une étude comparative portant sur des protéines provenant de différentes espèces de cette famille a mis en évidence que, dans cette région N-terminale, un motif de 16 acides aminés était conservé (**N-x11-13-V-x2-A-T-x34-36-R-x7-8-W-R-x3-K-x12-G-x-E-x15-Lx11-12-D-x-G-R-x11-D-x7-R**, (Kay et al., 1999)). L'Epsine présente une structure N-terminale ayant 8 hélices de type alpha (hélice de structure secondaire en forme d'escalier en colimaçon stabilisée par les liaisons hydrogènes) ((Y. X. Mao et al., 2001), (De Camilli et al., 2002)). La première hélice $\alpha 0$ lui confère des capacités de liaison aux membranes. Je reviendrai sur l'importance de cette hélice $\alpha 0$ dans la section (3) « mode d'action ».

2. Le domaine ANTH

La protéine AP-180 possède également une région en N-Terminale conservée dans plusieurs espèces notamment chez la levure, la souris, et l'homme ((Wendland et al., 1998), (Y. X. Mao et al., 2001)). La séquence de cette région est si similaire à celle des protéines à domaine ENTH qu'elle fût initialement considérée comme appartenant à cette famille. En 2002, une classification plus précise de ces protéines a été réalisée révélant une séquence consensus différente entre ces deux familles (Ford et al., 2002). AP-180 définit donc la famille de type ANTH pour AP-180 N-Terminal Homology (Ford et al., 2002). Cette région N-terminale d'AP-180, constituée de 300 résidus d'acides aminés, code pour 10 hélices de type alpha (Y. X. Mao et al., 2001).

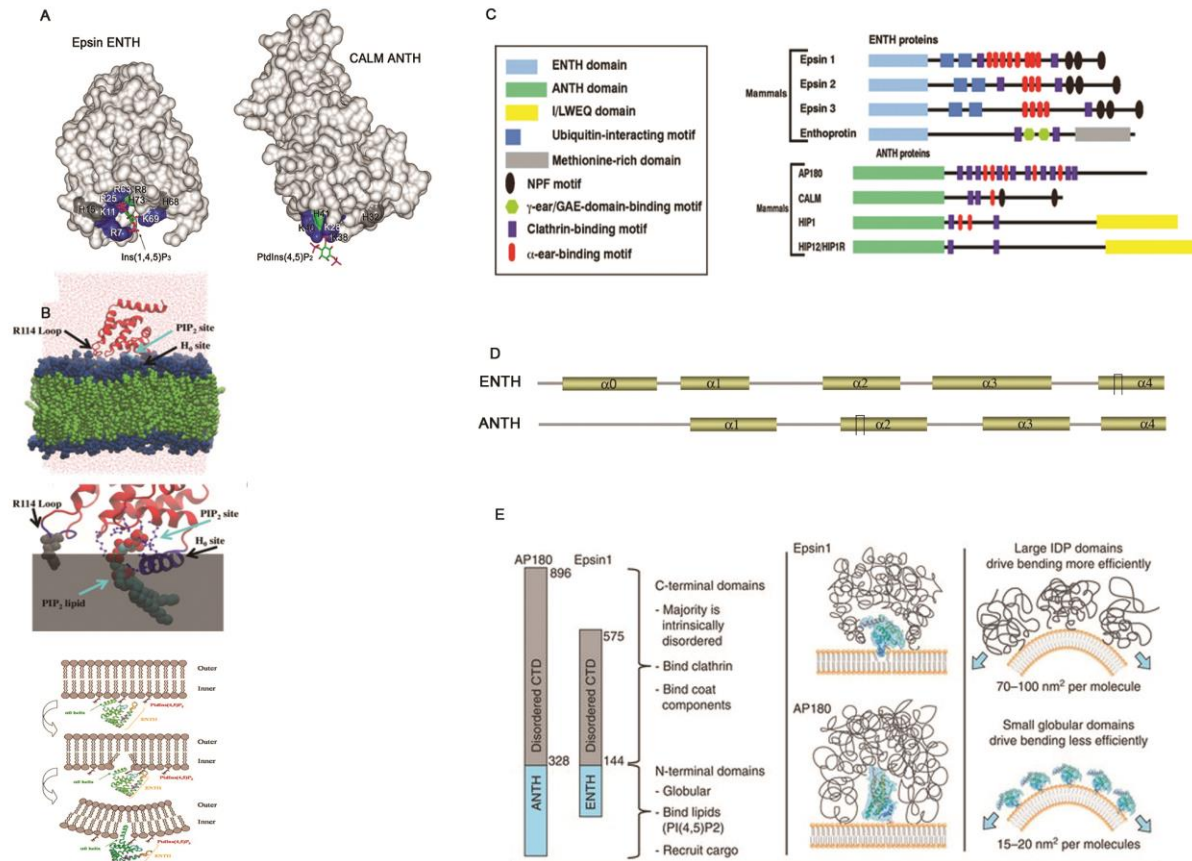


Figure 1: La courbure des membranes par les protéines à domaine ENTH et ANTH

- (A) Exemple de structure en 3 dimensions des protéines à domaine ENTH (Epsine) et ANTH (AP180).
- (B) Les trois sites d'insertion des protéines à domaine ENTH dans la bicouche lipidique sont : l'inter-hélice 6-7 (R144), PiP2 et hélice amphipathique ($\alpha 0$). Cela conduit à la déformation des membranes.
- (C) La structure des protéines à domaine ANTH et ENTH montre que ces deux familles possèdent une région qui leur est propre. Elles ont aussi dans leur séquence un motif de liaison à la clathrine.
- (D) Les protéines à domaine ENTH possède une hélice amphipatique absente chez celles à domaine ANTH.
- (E) Schéma résumant l'ensemble des fonctionnalités des différentes régions de ces deux familles de protéines. La liaison de ces deux familles à la bicouche lipidique conduit à la déformation des membranes. Le degré de courbure est différent entre ces deux familles.

Figure réalisée à partir des références suivantes : (Busch et al., 2015; Y. X. Mao et al., 2001)

Il y a quatre membres dans cette famille : AP-180, PICALM (« Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein »), HIP1 (« Huntingtin-Interacting Protein 1 ») et HIP1R (« Huntingtin-Interacting Protein 1 Related »).

En conclusion, les protéines de type ANTH et ENTH présentent de fortes similarités structurales. L'alignement des séquences des domaines ANTH et ENTH montre qu'ils présentent plusieurs hélices alpha ((Y. X. Mao et al., 2001), (Hom et al., 2007)) et possèdent des particularités physico-chimiques similaires, comme leur capacité à se lier aux membranes (Stahelin et al., 2003).

b. Différences structurales

Parmi les 16 résidus d'acides aminés hautement conservés dans les domaines ENTH, seuls 9 sont communs aux domaines ANTH : N-x11-13-V-x2-A-T-x34-36-R-x7-8-W-R-x3-K-x12-G-x-E-x15-L-x11-12-D-x-G-R-x11-D-x7-R (Kay et al., 1999). Malgré ces différences, la structure en hélice est conservée dans les deux domaines. La différence structurale essentielle entre ces deux domaines vient de l'hélice α_0 que seules les protéines de type ENTH possèdent (Hom et al., 2007). Un test de co-sédimentation sur des liposomes de différentes compositions lipidiques a mis en évidence que les domaines ENTH et ANTH reconnaissent chacun majoritairement un phosphoinositide (Pi) biphosphate, le $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ (Itoh et al., 2001). La dimérisation de l'Epsine a été révélée, *in vitro*, en utilisant une technique basée sur la résonance des électrons libres (EPR) (Lai et al., 2012).

L'interaction avec le $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ se fait grâce à une cavité formée par certains résidus des hélices α_1 , 3 et 4 et l'interhélice 1-2 (position 7, 9, 14, 23 et 42) qui permet aux domaines ENTH de s'associer aux phosphoinositides (Pi) et de s'insérer via l'hélice α_0 dans la bicouche lipidique. Quant au domaine ANTH, la liaison se fait uniquement *via* une surface contiguë interagissant avec la membrane plasmique, grâce à certains résidus des hélices α_1 , α_2 et l'interhélice 1-2

(Itoh et al., 2001), (Ford, 2001), (Ford et al., 2002), (De Camilli et al., 2002), (Stahelin et al., 2003), (Hom et al., 2007), (Y. Yoon et al., 2010)) (Figure 1).

c. Mode d'action

Une étude, menée en 2002, a illustré l'importance de l'hélice $\alpha 0$ dans la capacité de l'Epsine à faire des tubules en présence de liposomes (Ford et al., 2002). La liaison au PIP2 pourrait permettre la formation de l'hélice $\alpha 0$. La présence de ces tubules révèle que la déformation des membranes est indispensable pour pouvoir former ces structures. Les mutations dans la séquence codant l'hélice $\alpha 0$ entraînent une diminution de l'association de l'Epsine aux liposomes mais aussi une réduction du nombre de tubules induits (Ford et al., 2002). Une étude plus détaillée, menée en 2009, a montré que la concentration locale de l'Epsine pourrait aussi jouer un rôle dans le degré de courbure de la membrane (Y. Yoon et al., 2010). L'organisation en dimère de l'Epsine serait lié à la dimérisation de l'hélice $\alpha 0$ (position 5 à 14, (Y. Yoon et al., 2010)) qui, en s'insérant partiellement dans le feuillet de la bicouche lipidique, conduirait ainsi à la formation d'une courbure stable de la membrane (Lai et al., 2012).

Les protéines de type ENTH sont capables de détecter de fortes courbures et de produire des tubules sur des liposomes de petite taille (100 nm) (Y. Yoon et al., 2010). La mutation des nucléotides codant les résidus d'acides aminés en position 23 et 42 du domaine ENTH, résidus permettant l'interaction avec la membrane, est suffisante pour perdre la capacité de former des tubules *in vitro* (Y. Yoon et al., 2010). Deux ans plus tard, la présence de trois sites de contact avec la membrane, l'inter-hélice 6 à 7 (résidu 114), le site de reconnaissance du PiP2 (cavité) et l'hélice $\alpha 0$, a été montré par EPR (Lai et al., 2012). Les études réalisées dernièrement montrent que l'Epsine a une nette préférence pour les fortes courbures membranaires déjà formées ((Capraro et al., 2010), (Holkar et al., 2015)). En effet, à l'aide de « Giant Unilamellar

Vesicles » (GUVs), Capraro et al ont pu produire des tubes artificiels en produisant des forces sur la membrane à l'aide d'une micropipette et ont observé la présence de l'Epsine sur ces extensions de membrane de diamètres allant de 25 à 140 nm (Capraro et al., 2010). A la différence des protéines de type ENTH, les protéines de type ANTH sont capables de courber des membranes en s'oligomérisant, mais n'induisent pas des tubules *in vitro*.

En conclusion, les protéines de cette superfamille déforment donc les membranes par le biais de deux mécanismes distincts, par leur liaison aux phosphoinositides et/ou par leur insertion dans les membranes grâce à l'hélice $\alpha 0$ (ENTH).

ii. La superfamille des protéines possédant un domaine BAR

a. Présentation

Cette superfamille se caractérise par un domaine « Bin-Amphyphysin-Rvs » (BAR) qui confère aux protéines la capacité de courber les membranes. Les protéines Bin, Amphiphysin, Rvs sont les premières protéines identifiées comme porteuses de ce domaine constitué de 3 hélices de type alpha (Peter et al., 2004). Je regrouperai les protéines possédant un domaine BAR en fonction du type de courbure (positive ou négative) puis du degré de courbure qu'elles induisent. Les courbures positives correspondent aux déformations de membrane qui s'orientent vers l'intérieur de la cellule/du liposome (invagination) contrairement aux courbures négatives qui produisent des protrusions membranaires vers l'extérieur. Parmi les autres structures constituant ces protéines, certaines peuvent avoir une action complémentaire au domaine BAR.

b. Les différentes classes

Je diviserai la superfamille des protéines à domaine BAR en trois classes : les courbures de forte intensité (BAR classique, N-BAR, BAR-PH, PX-BAR), les courbures de faible intensité (F-BAR) et les courbures inverses (I-BAR) (Figure 2).

1. Les courbures de forte intensité

➤ BAR classique

Les protéines composant cette catégorie, Arfaptins, « Islet Cell Antigen 69 kDa » ICA69, PICK1, Tuba, possèdent uniquement un domaine BAR. Cette structure, composée de 3 hélices de type α de 50 à 60 résidus d'acides aminés chacune, est capable de se dimériser sous la forme d'une banane afin de stabiliser les courbures membranaires (Peter et al., 2004). Ces protéines ne possèdent aucun autre domaine permettant la déformation de la membrane.

➤ N-BAR

Les protéines de cette classe possèdent, outre le domaine BAR, une hélice de type alpha nommée H0, constituée d'une vingtaine résidus d'acides aminés, qui permet à la protéine de s'insérer directement dans la bicouche lipidique (Peter et al., 2004). Cette hélice H0 augmente la capacité de la protéine à déformer les membranes. Toutefois, la délétion de l'hélice H0 ne fait que réduire la liaison de la protéine tronquée aux liposomes *in vitro* (Peter et al., 2004) suggérant une action coopérative entre le domaine BAR et l'hélice H0.

Tout comme l'epsine, les protéines ayant un domaine N-BAR (BAR-H0) insèrent leur hélice dans le feuillet membranaire. L'Amphiphysines/BINs, endophilines/BIFs et les nadrines composent cette famille des protéines N-BAR. L'ajout de l'hélice H0 sur une construction codant la centaurine β , lui confère la capacité de former des vésicules sur les liposomes (Boucrot et al., 2012). L'insertion de l'hélice amphipatique à la membrane permettrait de réduire l'angle du dimère des protéines N-BAR et, ainsi, de stabiliser des courbures beaucoup plus fortes.

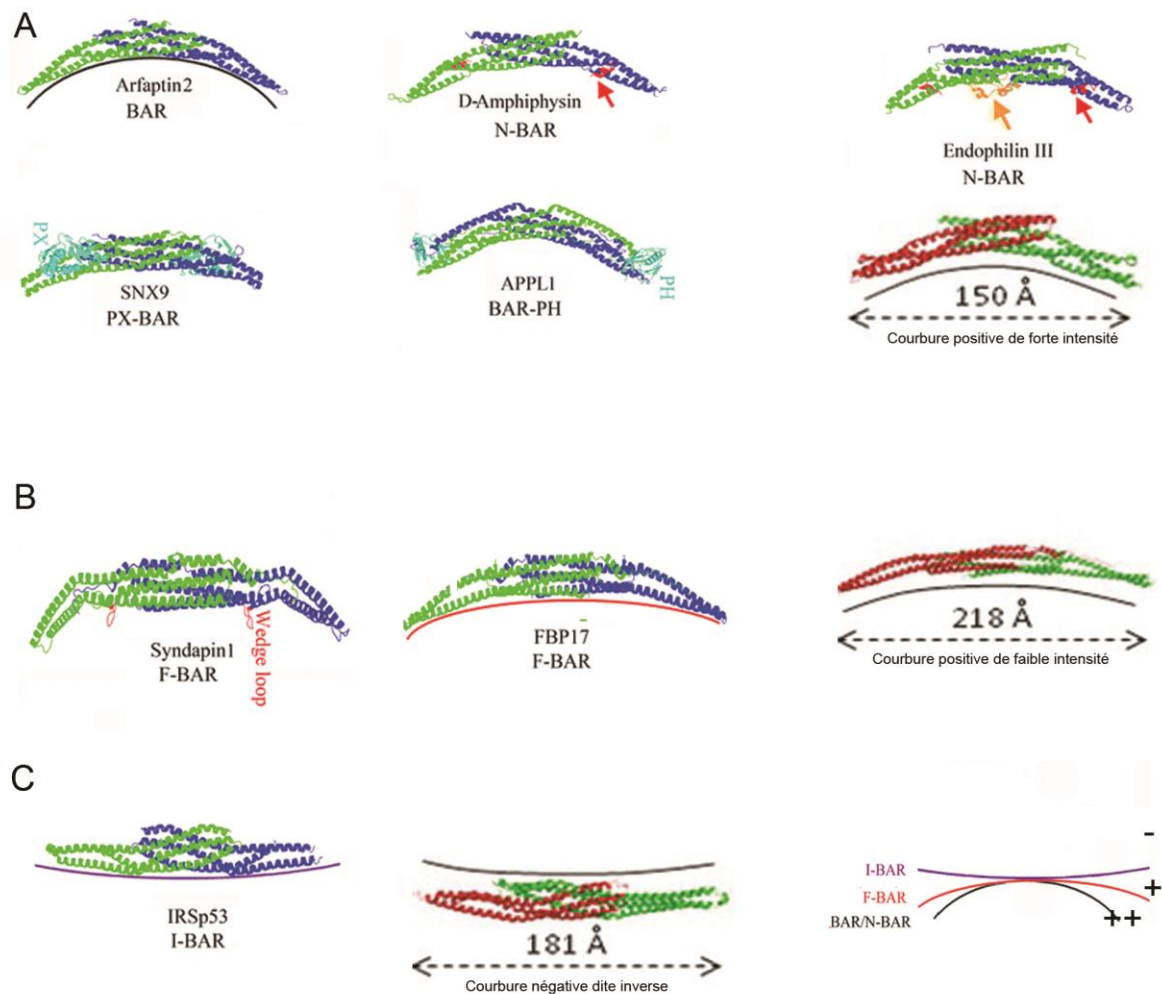


Figure 2 : Les protéines courbant les membranes de la famille des protéines à domaine BAR

(A) Exemple de protéines (BAR, N-BAR, PX-BAR, PH-BAR) conduisant à la formation de courbure positive de forte intensité.

(B) Exemples de protéines (F-BAR) dont la liaison aux membranes forme des courbures positives de faible intensité.

(C) Exemple de protéines (I-BAR) produisant des courbures négatives en se liant aux membranes.

(D) Représentation schématique des trois types de courbures : positive de faibles intensités (+), positive de fortes intensités (++) et négative (courbure inverse, -)

Figure adaptée de ((Rao & Haucke, 2011; H. Zhao et al., 2012), (Li, Mao, Dong, Liu, & Tong, 2007; Suarez et al., 2014))

Les protéines RVS161/167 sont des homologues des endophilines chez la levure. L'ajout de ces dernières sur des liposomes génère la production de microdomaines lipiques (H. Zhao et al., 2012). L'ajout de RVS 161/167 conduit à un regroupement local de PIP2 avant de produire des tubules (H. Zhao et al., 2012). Ces données suggèrent que les endophilines pourraient conduire à la formation ou assurer le maintien de microdomaines lipidiques.

➤ **BAR-PH**

Le domaine BAR-PH correspond au domaine BAR (3 hélices de 50 à 60 résidus d'acides aminés puis d'une hélice de 40 résidus d'acides aminés) suivi d'un domaine « Pleckstrin Homology » (PH), correspondant à une séquence d'environ 120 résidus d'acides aminés (Haslam, Koide, & Hemmings, 1993). Ce second domaine code principalement pour des feuillets β , une structure secondaire de chaînes de résidus d'acides aminés sous forme d'accordéon stabilisée par des liaisons hydrogènes, qui se trouve contiguës au domaine BAR. Ce domaine PH se lie aux phosphoinositides PI(3,4)P2 et PI(3,4,5)P3. Les protéines appartenant à cette famille, oligophrenins, APPLs, GRAFs, centaurine- β s, possèdent à la fois un domaine BAR (légèrement modifié : 4 hélices au lieu de 3) et un domaine PH (position 278 à 374 pour APPL1) dont l'action conjointe conduit à la déformation de la membrane ((Li et al., 2007), (Shinozaki-Narikawa et al., 2006)).

➤ **PX-BAR**

Le domaine « PhoX-BAR » (PX-BAR) est une séquence d'une centaine de résidus d'acides aminés composée de 3 feuillets beta (PX) suivis de 3 hélices alpha (BAR) qui permettent à la protéine de se lier aux membranes (Teasdale & Collins, 2012). Ce domaine PX est présent dans la séquence de plusieurs membres de la famille des Sorting Nexins (SNX) qui sont principalement impliqués dans le trafic intracellulaire. Une séquence consensus « R[Y/F]_{x23}–30K_{x13}–23 » a été identifiée comme responsable de la liaison aux phosphoinositides. Les SNXs-BAR sont capables de s'homodimériser ou s'hétérodimériser via le domaine BAR (van

Weering et al., 2012). Parmi les 33 SNX, seules 12 membres sont capables d'induire des courbures membranaires grâce à leur domaine PX-BAR, il s'agit de SNX1, SNX2, SNX4, SNX5, SNX6, SNX7, SNX8, SNX9, SNX18, SNX30, SNX32 et SNX33. Parmi ces protéines, seules trois possèdent un domaine SH3 d'une cinquantaine de résidus d'acides aminés : SNX9, SNX18 et SNX33. Les SNX-BAR sont toutes capables de se lier aux liposomes et certaines (SNX1, SNX2, SNX4, SNX8, SNX9, SNX18 et SNX33) forment aussi des tubules *in vitro* sur des liposomes de taille moyenne (200 nm) (van Weering et al., 2012). Les protéines SNX1, SNX5 et SNX8 forment également des tubules dans la cellule (van Weering et al., 2012). Les 12 SNXs-BAR ont toutes une hélice amphipathique d'une dizaine de résidus d'acides aminés essentiellement de type non-polaires (Glycine, Valine, Alanine, Phenylalanine, Leucine, Isoleucine, Proline, Methionine, Tryptophane, van Weering et al., 2012). Par exemple, celle de SNX9 est constituée de résidus d'acides aminés hydrophobes **M-K-I-P-L-N-K-F-P-G-F-A-K** (Masuda et al., 2006; Pylypenko et al., 2007). Cette hélice est responsable de la formation des tubules sur les liposomes (van Weering et al., 2012).

2. Les courbures de faible intensité

➤ F-BAR

Les domaines de type F-BAR « FER-CIP4 Homology » (FCH-BAR), sont souvent localisés dans la partie N-terminale des protéines (Henne et al., 2007). Ce domaine BAR est constitué de 50 à 100 résidus d'acides aminés. Une séquence consensus, « R-x-**p**-[I/L/V]-E-**c**-x-Y-A-**c**-p-L-**p**-**c**-**ϕ**, propre à ce domaine a été identifiée en 2006 ('**p**' est un résidu d'acide aminé de type polaire; '**c**' de type chargé, '**ϕ**' de type hydrophobe) (Masuda et al., 2006). Dans cette région N-terminale, les résidus d'acides aminés à caractère hydrophobe sont particulièrement bien conservés parmi les membres de la famille F-BAR tels que FCHo1« FCH Domain Only 1 », FCHo2« FCH Domain Only 2 », Toca-1, FBP17 « Formin-binding protein 17 ». Ces structures sont capables d'interagir avec les membranes, sous forme de dimère, aussi bien *in vitro* qu'*in*

vivo, en stabilisant des courbures de faibles importances ((Henne et al., 2007), (Peter et al., 2004)). FCHo2 et TOCA-1 se lient peu, voire pas, aux liposomes de petite taille (50 nm) mais aux liposomes de grande taille (800 nm) correspondant à de très faibles courbures (Peter et al., 2004), (Tsujita, 2006), (Henne et al., 2007), (Takano et al., 2008)). En 2006, le domaine FCH a été réétudié puis renommé EFCH pour « Extended FER-CIP4 Homology » en y ajoutant un domaine « Coiled coil » correspondant à un enchevêtrement organisé de plusieurs hélices de type alpha. Ce domaine reconnaît la phosphatidylserine (PS) et les phosphoinositides PI(4,5)P2 et PI(3, 4, 5)P3. Toutefois, ce domaine bien que capable de conduire à une dimérisation, est structuralement différent du domaine BAR (Tsujita, 2006).

La séquence du domaine F-BAR comporte des groupes de résidus chargés positivement (lys, arg). L'interaction entre ce domaine et la membrane est stabilisée par les charges négatives des phospholipides de la bicouche lipidique ((Arkhipov et al., 2009), (Y. Yin et al., 2009)). Le domaine F-BAR n'ayant pas d'autre domaine se liant ou s'insérant dans la membrane, l'angle formé par la dimérisation des domaines F-BAR interagissant avec la membrane est très obtus (proche de 180°).

3. Les courbures inverses

➤ I-BAR

La particularité de cette classe de protéines vient du fait que la courbure membranaire, produite par l'équivalent du domaine BAR nommé IMD pour « IRSp53/MIM homology domain », est dite « négative » d'où leur nom I-BAR (« Inverse-BAR »). Le domaine I-BAR produit donc des protrusions, les tubules se formant vers l'extérieur de la cellule, car sa surface d'interaction avec la membrane est inversée par rapport à celle des autres familles de protéines (Mattila et al., 2007). Cela a été montré par des expériences *in vitro* mais aussi *in vivo* (Pykäläinen et al., 2011). Les différences structurales entre le domaine BAR classique et le domaine IMD sont

faibles, le second possède également 3 hélices (de 50 à 100 résidus d'acides aminés en moyenne) suivi d'une hélice alpha supplémentaire d'une dizaine de résidus d'acides aminés (Millard et al., 2005).

IRSp53, MIM, ABBA appartiennent à cette classe et possèdent aussi une hélice amphipatique ((Millard et al., 2005, Suetsugu et al., 2006), (Saarikangas et al., 2009)). La dimérisation du domaine conduit à une structure en banane dont la face convexe est en contact avec la bicouche lipidique par l'intermédiaire de PI(3,4)P2 and PI(4,5)P2 (Mattila et al., 2007). Seule la protéine Pinkbar « planar intestinal- and kidney-specific BAR domain protein » produit une très faible courbure (voire plane) sur des GUVs (Pykäläinen et al., 2011). En remplaçant les lysines (positions 109, 116, 135, 146) et les arginines (positions 127, 145, 147) en alanines dans la région d'interaction de la protéine Pinkbar avec la membrane, le groupe de Pekka Lappalainen a montré que cela affectait la capacité d'interaction avec les vésicules *in vitro* (Pykäläinen et al., 2011).

L'interaction du domaine avec la membrane se fait *via* le PI(4,5)P2 comme l'illustre la colocalisation de la protéine Pinkbar et les phosphoinositides sur les GUVs (Saarikangas et al., 2009). En utilisant la technique de FRAP « Fluorescence Recovery After Photobleaching », qui consiste à éteindre la fluorescence localement puis à observer le temps que la molécule d'intérêt met à remplacer ces molécules photoblanchies, ils ont pu observer que Pinkbar induit également un regroupement des PI(4,5)P2. L'absence de réapparition de fluorescence dans la région photoblanchie illustre l'absence de diffusion latérale du « cluster » de PI(4,5)P2 interagissant avec Pinkbar (Pykäläinen et al., 2011). Ce mécanisme d'action semble être partagé avec les autres types de domaine BAR.

c. Synthèse et différences des protéines à domaine BAR

Le mécanisme d'action du domaine BAR dépend de sa classe d'appartenance. La dimérisation du domaine BAR est variable d'une protéine à une autre mais est clairement facilitée car libérateur d'énergie (Masuda & Mochizuki, 2010). En outre, la dimérisation peut se produire entre deux mêmes protéines (homodimère) ou entre deux protéines différentes (hétérodimère).

Les protéines courbant les membranes sont essentiellement composées d'une structure hélicoïdale (3 hélices en moyenne), organisées souvent en dimère dont la surface stabilise la membrane et présentent une structure hélicoïdale (hélice α) d'une dizaine de résidus d'acides aminés permettant leur insertion dans le feuillet de la bicouche lipidique. C'est cette seconde structure qui imposerait le degré de courbure de la membrane. Certaines protéines possèdent aussi un domaine complémentaire PX ou PH qui reconnaît les membranes et participerait aussi à l'angle formé avec la membrane.

iii. Les protéines de type ALPS

a. Présentation

ArfGAP1 (« ADP-Ribosylation Factor GTPase-Activating Protein 1 ») est une protéine de 415 résidus d'acides aminés qui se lie aux membranes *via* la partie centrale (position 192 à 257) (Bigay et al., 2005). Pour en faire la démonstration, le groupe de Bruno Antonny a étudié l'effet de différentes formes tronquées de la protéine sur sa capacité à se lier aux membranes et ont proposé aussi la présence d'une hélice amphipatique de type α ((Bigay et al., 2005), (Krabben et al., 2011)). La protéine ArfGAP1 a donc été classifiée dans la catégorie des protéines à domaine ALPS (« *arfGAP1/amphipathic lipid packing sensor* »). J'utiliserai quelques protéines appartenant à cette famille pour illustrer l'importance du motif ALPS.

b. Particularités des motifs ALPS

En 2006, la région centrale de ArfGAP1 a été étudiée et la présence de deux motifs d'une quarantaine de résidus d'acides aminés a été identifiée (Mesmin et al., 2007). L'étude de ces deux motifs (positions 199-234 et 264-295) a mis en évidence un enrichissement en deux acides aminés hydrophiles : la serine et la thréonine (Mesmin et al., 2007). ArfGAP1 est localisée dans l'appareil de Golgi mais aussi dans le cytoplasme (Levi et al., 2008).

GMAP-210 « Golgi-Associated Microtubule-Binding Protein 210 » possède un motif ALPS en positions 1 à 38, Kes1p en positions 7 à 29, Nup-133 « Nucleoporin protein 133 » en positions 245 à 267 et Syndapine en positions 69 à 96 ((Drin et al., 2007), (Krabben et al., 2011)). Ainsi, la position du motif ALPS dans la séquence polypeptidique n'est pas importante.

La technique de « Molecular Dynamic » MD simulation permet de modéliser le comportement dynamique au niveau atomique en se servant des lois de la physique. Ces simulations MD suggèrent que les ALPS utiliseraient l'absence locale de lipides pour s'insérer dans la membrane (Vanni et al., 2013).

Sar1 forme des tubules sur les liposomes uniquement en présence de GTP, ce qui signifie que son action est énergie dépendante (M. Lee et al., 2005). La délétion de l'hélice conduit à une diminution du nombre de tubules d'un facteur 7 (M. Lee et al., 2005).

En conclusion, les protéines de type ALPS se caractérisent par la présence d'un motif, exceptionnellement de deux motifs, d'une trentaine de résidus d'acides aminés comportant essentiellement des résidus Ser et Thr (Drin et al., 2007).

c. Mode d'action

Le motif ALPS confère des propriétés physico-chimiques très particulières aux protéines. En effet, son enrichissement en acides aminés hydrophiles et la présence de résidus glycine, apportant une certaine flexibilité dans la structure secondaire, permet aux protéines de se lier

aux membranes. La présence d'hélice amphipatique de type α a été proposée pour expliquer pourquoi ArfGAP1 serait sans structure secondaire particulière en solution en absence de liposomes (Krabben et al., 2011). Cette hélice se formerait en présence de fortes courbures de la membrane, à stabiliser, en s'insérant dans la membrane (Krabben et al., 2011). Antonny *et al* ont montré par «fluorescence resonance energy transfer» FRET qu'ArfGAP1 a deux configurations : ArfGAP1-GDP (sous forme inactive) et ArfGAP1-GTP (forme active avec hélice fonctionnelle, énergie dépendante) (Antonny et al., 1997).

B. Les autres facteurs courbant les membranes

i. Les manteaux

Les manteaux sont des protéines structurelles enveloppant des membranes. Leur assemblage en structure complexe joue un rôle sur la taille des vésicules. Ils ont une action indirecte sur la courbure de la membrane *via* des protéines accessoires qui reconnaissent les protéines du manteau d'une part et la membrane de l'autre. Leur assemblage « en cage » force ou stabilise la déformation de la membrane.

Je présenterai les manteaux les plus connus : clathrine, COP I, COP II et la cavéoline (Figure 3). La clathrine, COPI et COPII sont des manteaux qui recouvrent les vésicules. Ils sont structuralement proches une fois assemblés expliquant pourquoi il a été difficile de les distinguer initialement (Figure 3A). Les protéines permettant l'assemblage de ces manteaux, telles que de la β -adaptine pour le manteau clathrine et la β -COP pour le manteau COPI, partagent de fortes similarités structurales (Duden et al., 1991). Cela suggère que les manteaux ont deux rôles, former la vésicule et conduire au recrutement spécifique du cargo. De plus, la localisation des vésicules à clathrine dans la cellule est différente de celle des vésicules

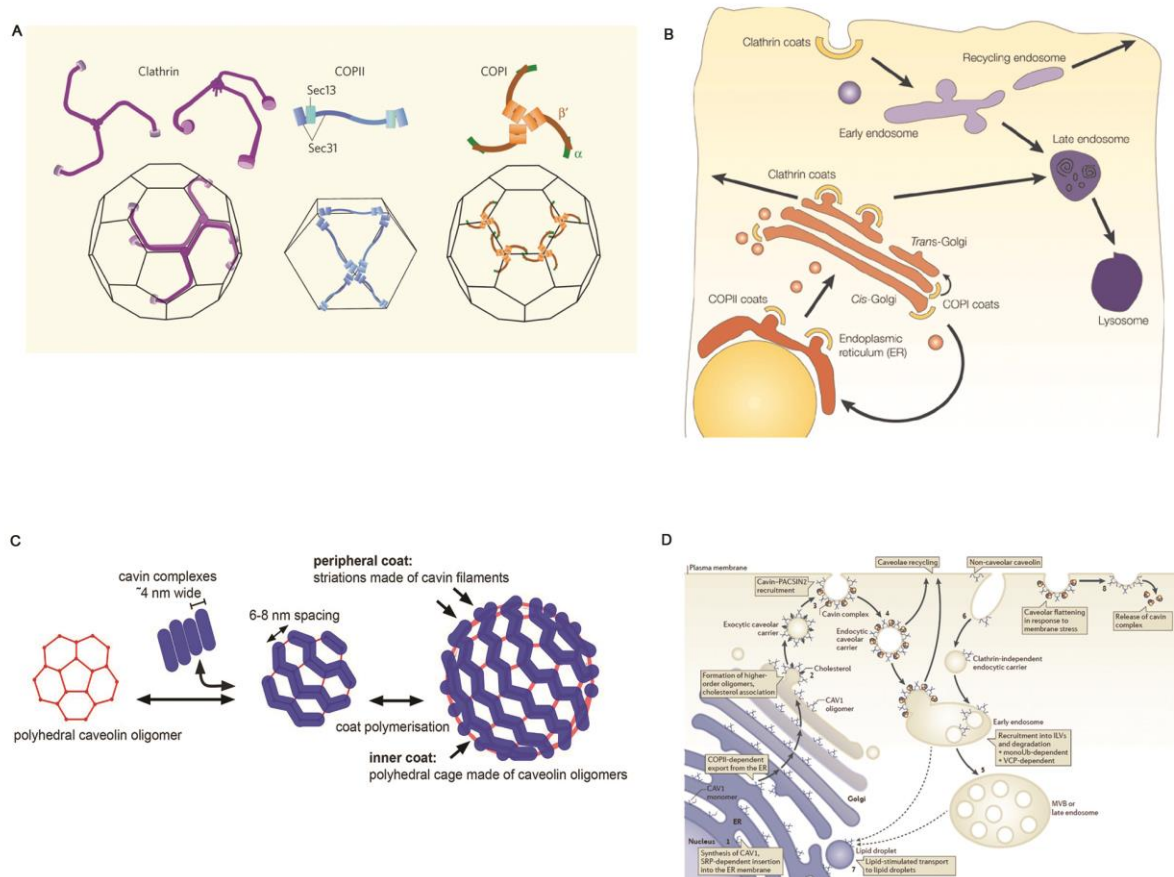


Figure 3 : Les différents manteaux identifiés chez les mammifères et leur localisation.

- (A) Illustration représentant les vésicules à manteaux COP I, COP II et clathrine qui sont similaires en taille et en structure.
 - (B) Localisation des vésicules à manteaux COP I, COP II et clathrine dans la cellule.
 - (C) Le manteau des cavéoles est constitué d'un recouvrement en cavéoline lui-même recouvert par les cavines.
 - (D) Localisation des cavéoles dans la cellule.
- Figure adaptée de ((Duden et al., 1991) ; (Kirchhausen, 2000), (Harrison & Kirchhausen, 2010; Roth & Porter, 1964))

COPI et II, montrant l'importance d'un motif ou d'une protéine reconnaissant spécifiquement le contenu de la vésicule (cargo) et sa localisation dans la cellule (Figure 3B).

a. Le manteau à clathrine

En 1964, Thomas F. Roth et Keith R. Porter ont découvert une structure de type vésicule opaque aux électrons chez le moustique (Roth & Porter, 1964). Cinq années plus tard, Toku Kanaseki et Ken Kadota ont visualisé des structures ressemblant à un ballon de football qu'ils ont appelé des vésicules à manteau (Kanaseki & Kadota, 1969). En 1975, à partir de nouvelles photographies prise en microscopie électronique, cette structure observée en marquage négatif en forme de pentagone et d'hexagone a été nommée « clathrine » ((Kanaseki & Kadota, 1969), (Pearse, 1975), (Pearse, 1976)). Cette même année, l'amélioration de la purification de ces vésicules sur gel « Sodium Dodecyl Sulfate » (SDS) a montré que ces vésicules à clathrine étaient liées à la présence d'une protéine de 180 kDa (Pearse, 1975).

Le manteau à clathrine s'initie principalement à la membrane plasmique. La structure de la clathrine en triskèle est composée de deux types de chaînes : une légère (25 kDa) et une lourde (190 kDa). Un triskèle est formé de la trimérisation de trois chaînes légères et de trois chaînes lourdes. L'association des trois chaînes se fait au niveau de la région C-terminale. Les triskèles sont ensuite assemblés pour former une cage d'environ 90 nm. A noter que la clathrine peut s'associer *in vitro* pour former la cage. Toutefois, *in vivo*, la reconstitution de la clathrine ne peut avoir lieu sans protéines accessoires telles que « adaptor protein 2 » AP2 pour faire le lien entre la membrane et les triskèles du manteau (Figure 4C).

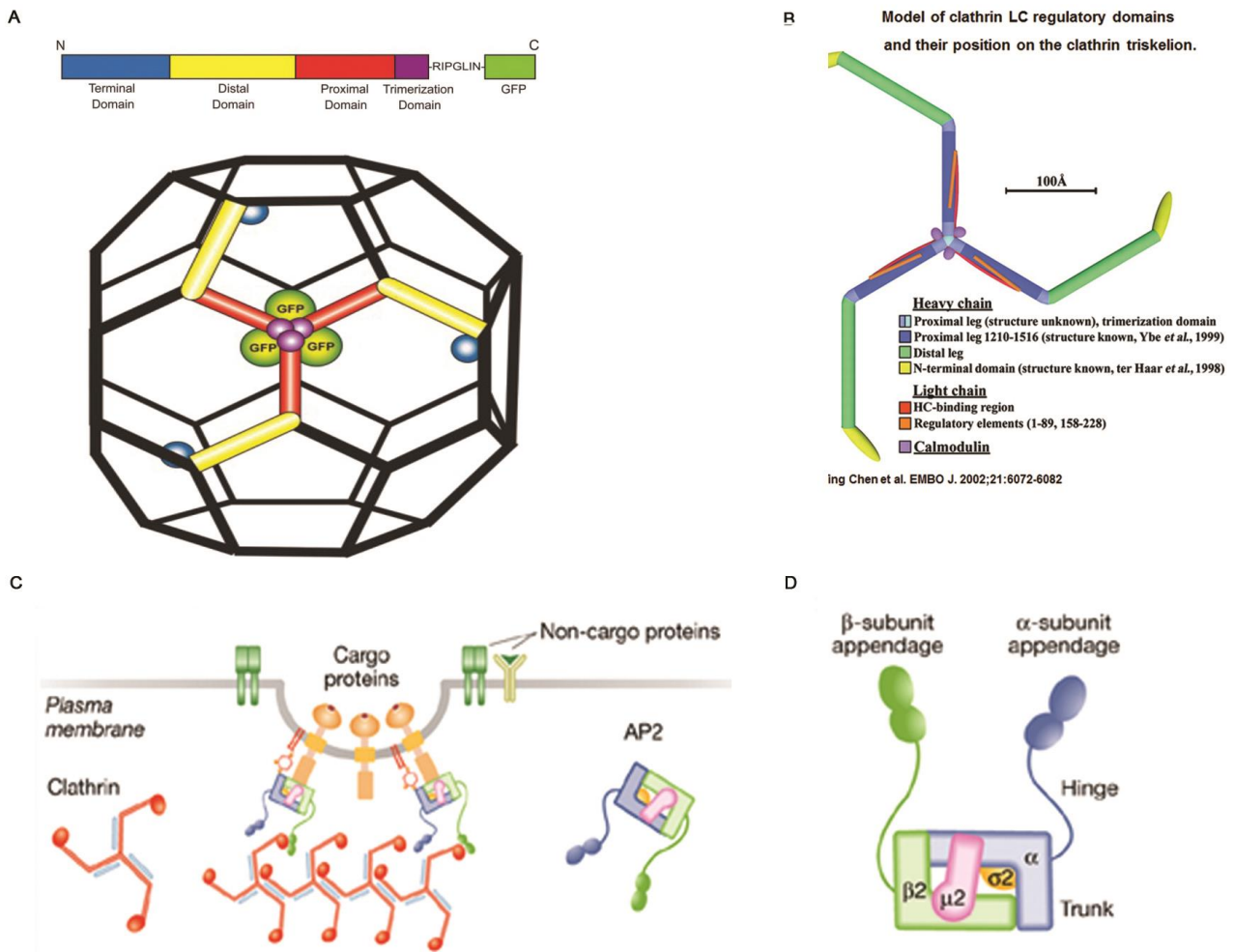


Figure 4 : Le triskèle et l'assemblage du manteau à clathrine

- (A) Reconstitution *in vitro* du triskèle à l'aide d'une construction lié à la GFP.
- (B) Modèle du triskèle et les fonctionnalités identifiées de ces différentes régions.
- (C) Assemblage du manteau à clathrine par interaction avec le complexe AP2 qui reconnaît lui-même spécifiquement le cargo.
- (D) Illustration représentant les différentes sous-unités du complexe AP2 indispensable pour permettre la formation du manteau à clathrine.

Figure réalisée à partir des références suivantes : (Ambroggio, Sillibourne, Antony, Manneville, & Goud, 2013; C. Y. Chen et al., 2002)

b. Le manteau COP I et COP II

En 1986, une nouvelle structure en manteau, dépourvue de clathrine, a été vue dans des coupes de microscopie électronique au niveau de l'appareil de Golgi (Orci, Glick, & Rothman, 1986). Ce manteau est constitué d'une protéine de 110 kDa nommée « β -Coat Protein » β -COP (Duden et al., 1991).

1. Le rôle des protéines ALPS dans la formation du manteau

Il existe deux types de manteaux, COP I et COP II, permettant le transport de protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (transport antérograde, COP II) et inversement (transport rétrograde, COP I). L'implication de ces deux manteaux dans la courbure des membranes est facilitée par trois protéines appartenant à la famille des ALPS, Arf1 et ArfGAP1 pour COPI et Sar1 pour COP II. Arf1 est capable de recruter l'Arfaptin 2. Une technique de flottaison des liposomes a permis de montrer que l'Arfaptin 2 ne se lie aux liposomes que lorsque Arf1 est activé (forme ATP) (Ambroggio et al., 2013). Cela a été confirmé par étirement de GUVs, *in vitro* (Ambroggio et al., 2013). Toutefois, l'Arfaptin 2 peut exister sous deux formes, liées à l'ADP (inactive) ou à l'ATP (active).

2. La composition du manteau COP I

Le manteau COPI comporte au moins quatre sous-unités : α (160 kDa), β (100 kDa), γ (98 kDa) et δ (61 kDa) appartenant au « coatomer » (Waters, Serafini, & Rothman, 1991). Quatre ans plus tard, la composition du coatomer du manteau COP I a été précisée. Il est composé de sept protéines, α (160 kDa), β (107 kDa), β' (102 kDa), γ (98 kDa), δ (60 kDa), ϵ (36 kDa) et ζ (20 kDa) qui ont été identifiées par immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre β -COP (Lowe & Kreis, 1995).

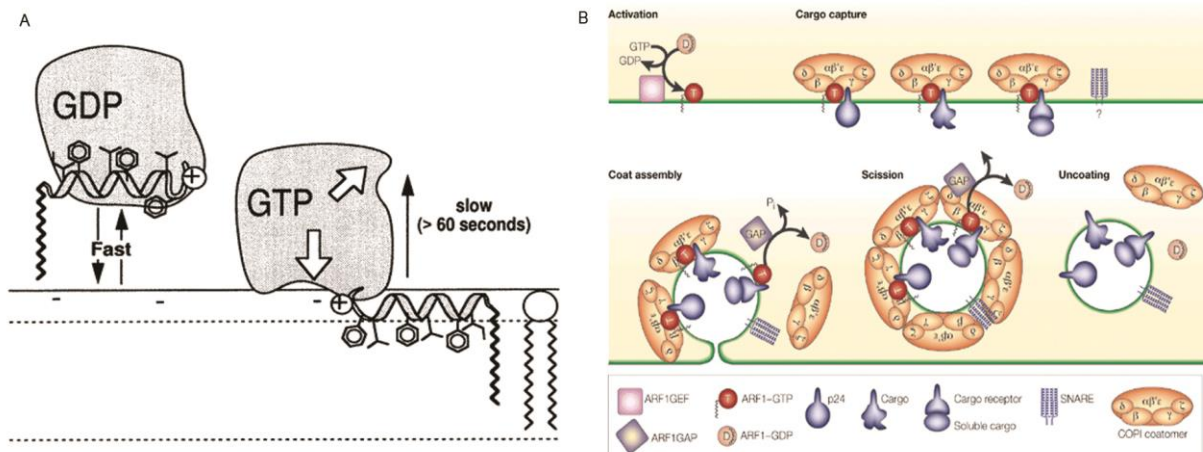


Figure 5 : Le manteau COP I et le fonctionnement de la protéine ARFGAP1

- (A) Illustration représentant l'insertion de la protéine ARFGAP1 dans la bicouche lipidique. En absence de GTP, l'hélice n'est pas formée et ne peut donc pas interagir avec la membrane. En revanche, la forme activée (GTP) conduit à l'incorporation de l'hélice entre les deux feuilletts.
- (B) Une fois l'insertion d'ARFGAP1 dans la bicouche lipidique, l'assemblage des différentes sous-unités « coatmer » se regroupe pour former un complexe reconnaissant le cargo qui constituera ensuite le manteau COP I.
- Références : (Antonny et al., 1997), (Jensen & Schekman, 2011) ; (Kirchhausen, 2000)

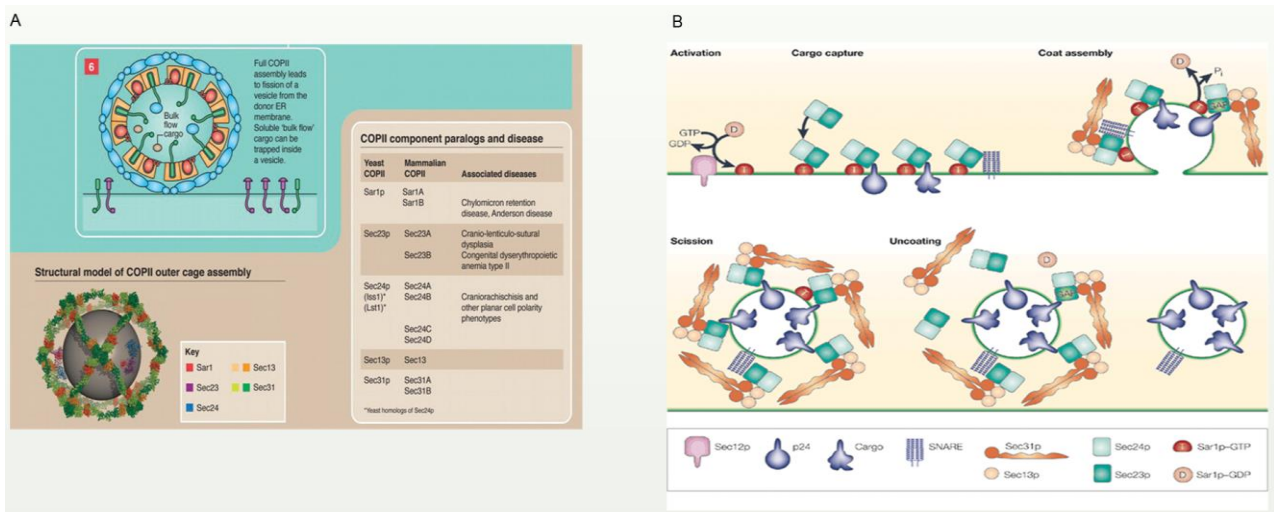


Figure 6 : Le manteau COP II formé à partir de la protéine SAR1

- (A) Structure de la vésicule recouverte par le complexe Sec23/24 interagissant avec Sec13/31 formant le « coatmer » qui se fixe au cargo via la protéine à motif ALPS nommée SAR1.
- (B) Illustration des différentes étapes de l'assemblage puis du désassemblage du manteau COP II.

Références : ((Fath, Mancias, Bi, & Goldberg, 2007); (Kirchhausen, 2000), (Jensen & Schekman, 2011); (Ludwig, 2016))

Ce complexe du manteau se désassemble en présence de fortes concentrations en sel mais peut se réassocier en condition physiologique. C'est ainsi qu'a été montré que α , β' et ϵ interagissent ensemble et que γ se lie à ζ . Le réassemblage *in vitro* du coatomer est possible en présence des différents éléments le constituant (Lowe & Kreis, 1995). Le manteau COP I s'assemble au niveau de l'appareil de Golgi (Cis golgien). La vésicule formée se dirige alors jusqu'au réticulum endoplasmique (RE).

3. La composition du manteau COP II

Chez la levure, le manteau COPII avec Sar 1, est constitué de quatre éléments : sec31/sec13 et sec23/sec24. Les protéines sec31/sec13 s'assemblent entre elles pour former des structures linéaires qui produisent la cage. Le complexe sec23/sec24/Sar1 fait la connexion entre la membrane plasmique, le cargo et la cage formée par le complexe sec31/sec13 (Fath et al., 2007). La formation du manteau COPII a été reconstituée entièrement, *in vitro*, sur des liposomes permettant l'observation de vésicules typiques des COP II (M. Lee et al., 2005). Les photos des liposomes révèlent l'absence de fermeture de ces vésicules, ce qui signifie que l'hélice de Sar1 est impliquée dans la fermeture et, donc, dans la scission de la vésicule (M. Lee et al., 2005). Le manteau COP II se forme au niveau du RE pour permettre à la vésicule de transiter dans la cellule jusqu'à l'appareil de Golgi (Cis).

c. Le manteau des cavéoles

1. L'importance de la cavéoline

La cavéoline 1 est une protéine de 22 kDa qui compose le manteau des cavéoles (Rothberg et al., 1992). Les images prises en microscopie électronique montrent des vésicules majoritairement non détachées de la membrane plasmique qui peuvent s'organiser en grappes. Vu du dessus (face cytosolique), ces vésicules semblent décorées d'un motif en spirale (Rothberg et al., 1992). La cavéoline 1 est capable de former des dimères mais aussi des formes oligomériques de 400 kDa (Ludwig, 2016). Contrairement aux manteaux COP et à la clathrine,

la cavéoline 1 est composée de plusieurs domaines d'insertion dans la membrane lui conférant un rôle direct dans la courbure membranaire. Récemment, le groupe de Robert G. Parton a construit des mutants de la cavéoline et a regardé l'effet de ces altérations sur la formation des cavéoles (Bastiani & Parton, 2010). Cela les a conduit à proposer un modèle présentant l'insertion des différents domaines de la cavéoline dans la bicouche lipidique (Ariotti et al., 2015). Le traitement par la protéinase K des cavéoles purifiées a permis d'observer le clivage de la cavéoline 1 (22 kDa) en deux fragments (environ 10 kDa) en présence d'un détergent (Ariotti et al., 2015). Les vésicules formées sont de l'ordre de 65 nm.

2. L'importance des cavines

La famille des cavines compte quatre membres (cavine 1, 2, 3 et 4) dont trois interagissent entre eux par homo-ou hétérodimérisation et avec la cavéoline 1/2 (Ludwig et al., 2013). La cavine 1, également appelée PTRF, est une protéine de 390 résidus d'acides aminés. Son implication dans la formation des cavéoles a été mise en évidence par immunofluorescence et fractionnement cellulaire (L. Liu & Pilch, 2008). Les cellules traitées avec du β -methylcyclodextrine, une drogue conduisant à l'extraction du cholestérol des membranes, empêche l'association de la cavine 1 et de la cavéoline dans les fractions correspondant aux radeaux lipidiques (L. Liu & Pilch, 2008).

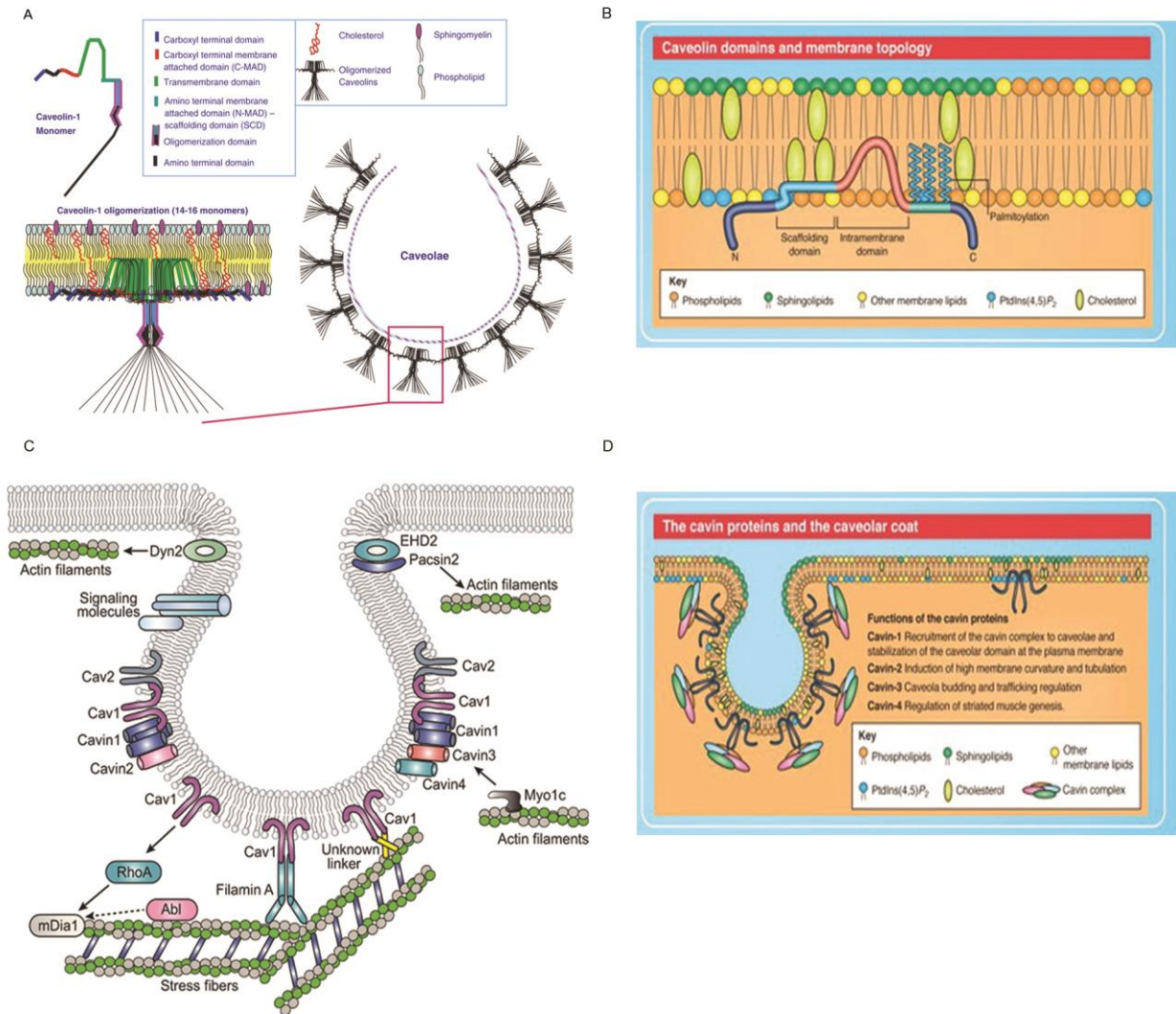


Figure 7 : L'insertion de la cavéoline dans la membrane et les protéines impliquées dans le manteau des cavéoles

- (A) Illustration de l'ancrage de la cavéoline dans la bicouche lipidique.
- (B) Agrandissement représentant l'insertion de la cavéoline dans la membrane au niveau d'une zone nommée radeaux lipidiques qui est enrichie en cholestérol et en sphingolipides. La palmitoylation de la cavéoline est nécessaire pour cette action d'ancrage à la membrane.
- (C) Les protéines impliquées dans la structure de la vésicule recouverte de cavéoline et celles nécessaires à l'interaction avec le réseau d'actine.
- (D) Schéma représentant une cavéole et les protéines ainsi que les lipides nécessaires pour former son manteau.

Figure réalisée à partir des références suivantes : (Bastiani & Parton, 2010; Ludwig et al., 2013)

L'association de la cavine 1 avec la cavéoline 1 semble indépendante des autres cavines (Ludwig et al., 2013). Les auteurs de cette étude se sont ensuite intéressés à la répartition des cavines et des cavéolines sur les vésicules (Ludwig et al., 2013). La superposition des coupes de cavéoles prises en microscopie électronique montre que la cavéoline et la cavine sont uniformément réparties autour des vésicules en forme de U (Ludwig et al., 2013).

3. La structure du manteau des cavéoles

Une modélisation en trois dimensions de la structure des cavéoles a révélé la présence de deux couches ; la plus interne serait constituée de la cavéoline 1 et la plus externe de cavine 1 (Figure 7, (Ludwig, 2016)).

En conclusion, les manteaux sculptent la membrane de la cellule pour former des vésicules. Ce processus nécessite des protéines adaptatrices permettant la reconnaissance du cargo, du manteau et de la bicouche lipidique. Seule la cavéoline, qui forme le manteau des cavéoles, conduit directement à la déformation de la membrane (mais nécessite les cavines) grâce à l'insertion de la protéine dans la bicouche. La taille des vésicules à clathrine (environ 90 nm), COP I (50 à 60 nm), COP II (60 nm) et les cavéoles (50 à 80 nm, en moyenne 65 nm) sont relativement comparables (50 à 100 nm).

ii. Les modifications lipidiques

Dans cette partie, je présenterai les protéines impliquées dans des modifications des lipides entraînant une courbure membranaire dans la cellule. Les lipides sont constitués de deux parties : l'une hydrophobe et l'autre hydrophile. Les lipides des membranes sont organisés sous la forme d'une double couche, où les parties hydrophobes des deux couches sont en contact. Cette structure permet, entre autre, de former l'enveloppe délimitant la cellule et la compartimentalisation intracellulaire des organelles. La membrane plasmique est composée de deux feuillets d'une épaisseur d'environ 7-8 nm. Elle est majoritairement composée de

phospholipides et de sphingolipides. La composition en cholestérol joue aussi un rôle dans la fluidité des membranes et la localisation des protéines à ancras GPI ainsi que sur le recrutement d'autres protéines (cavéoline).

Les glycérophospholipides PC, PE, PS, et PI composent les membranes plasmiques. Ils servent de précurseurs/messagers intra- ou intercellulaires et sont impliqués dans de nombreux mécanismes tels que l'inflammation.

La phosphatidylserine a un rôle essentiel conduisant à l'inflammation. Des phospholipases spécifiques des phospholipides permettent de former de nouveaux composés tels que l'acide phosphatidique qui est nécessaire pour différents processus comme la signalisation ou la déformation des membranes (Elvington & Nichols, 2007).

Les phospholipides sont constitués de deux familles : les glycerophospholipides (Glycérol + 2 acides gras + alcool) et des sphingolipides (sphingosine + 1 acide gras + choline). Les phospholipides peuvent se déplacer latéralement et d'un feuillet à l'autre (flip-flop). Toutefois, la vitesse de ces deux mécanismes est différente (Kornberg & McConnell, 1971).

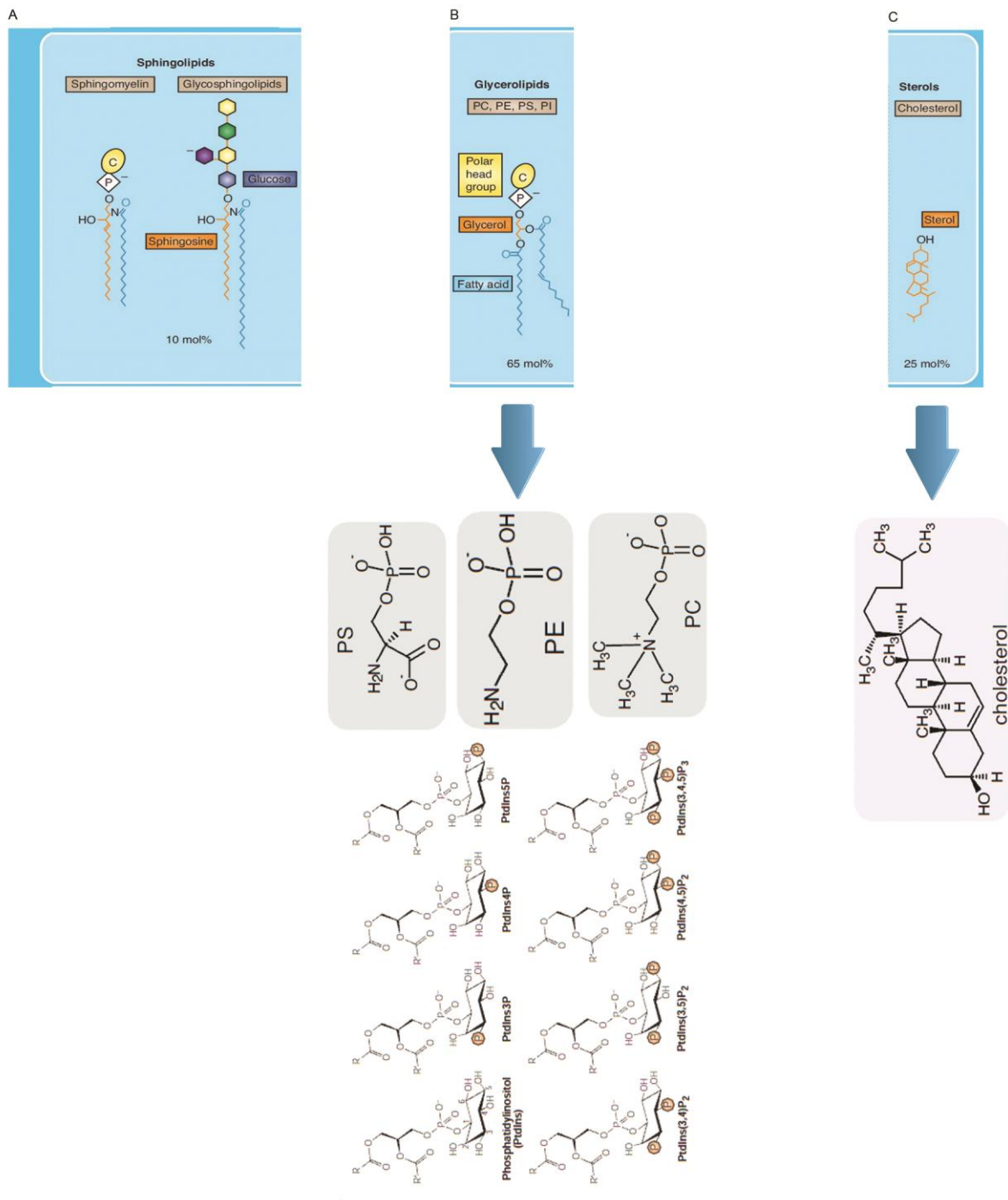


Figure 8 : Les trois familles de lipides constituant la membrane chez les mammifères

- (A) La première famille, appelée les sphingolipides, est composée de sphingomyélines et de glycosphingolipides.
- (B) La seconde famille comporte les glycérolipides regroupant le phosphatidylcholine (PC), le phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI).
- (C) La troisième correspond aux stérols dont le cholestérol fait partie.

Références : (Kornberg & McConnell, 1971) ; (Le Roy & Wrana, 2005), (van Meer & de Kroon, 2011)

a. La bicouche lipidique

En 1935, Danielli et Davson ont proposé les premiers modèles de ce qu'on appelle aujourd'hui la bicouche lipidique (Danielli et al., 1935). Cette dernière serait recouverte de chaque côté par une fine couche de protéines servant de barrière (de protection et d'échange) à la cellule (Danielli et al., 1935). Ils ont même évoqué la possibilité que la membrane soit une mosaïque de lipides et de protéines (Danielli et al., 1935). La répartition des lipides dans ces membranes n'est effectivement pas uniforme. Ce modèle mixte lipides et protéines, qui diffuseraient librement, a été confirmé en tant que « the fluid mosaic model » (Singer & Nicolson, 1972). Les premiers modèles proposant des regroupements lipidiques, nommés « radeaux lipidiques » ou « raft », dans la bicouche de la cellule ont fait leur apparition dans les années 1990-2000. Toutefois, la composition de ces radeaux n'est pas clairement élucidée, tout comme leur définition, et même leur existence est controversée.

b. Microdomaine – notion de radeaux lipidiques

Afin de détecter les radeaux lipidiques, une sonde fluorescente nommée Laurdan a été utilisée (Dietrich et al., 2001). Ce composé, qui reconnaît les groupements hydrophobes, est excité à 385 nm et émet soit vers 400 nm ou 550 nm selon que les lipides sont groupés ou non (H. M. Kim et al., 2007) ; (Sezgin et al., 2012). Pour étudier le comportement des membranes, l'utilisation de GUV « physiologique » (comportant des phospholipides et du cholestérol) est importante (Sezgin et al., 2012).

En étudiant le comportement d'un dérivé du laurdan (c-laurdan) dans les cellules, les auteurs ont observé deux populations de lipides (avec ou sans cluster, (H. M. Kim et al., 2007)). Puis, les cellules ont été incubées avec du β -methylcyclodextrine en présence de laurdan ou de son dérivé. Ce traitement a conduit à une diminution de la population correspondant aux regroupements lipidiques. Cependant, la population correspondant à l'absence de cluster n'aurait pas dû être affectée par ces traitements (H. M. Kim et al., 2007).

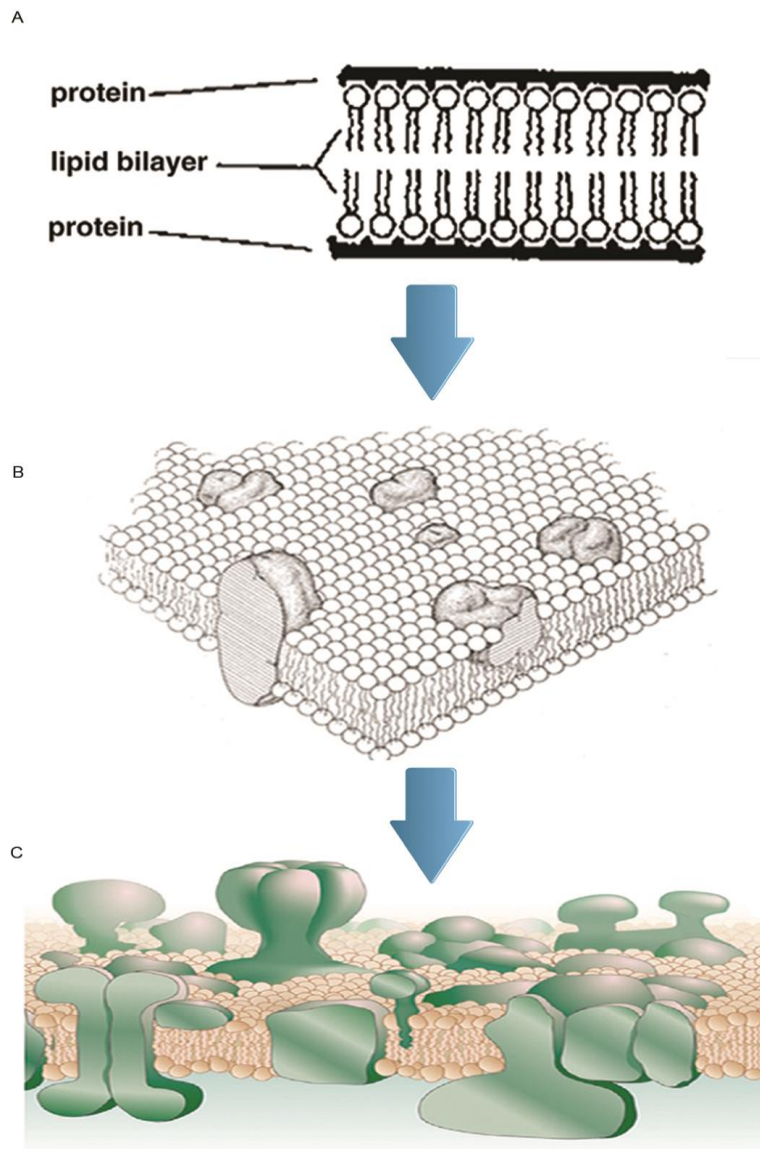


Figure 9 : L'évolution de la vision de la membrane plasmique au cours du XXème siècle

- (A) Modèle imaginé par Danielli et Davson en 1935. La notion de bicouche lipidique était alors déjà prise en considération mais la présence des protéines dans cette membrane n'était pas encore clairement définie. Les auteurs de cette publication pensaient qu'une couche de protéines recouvrait celles des lipides.
- (B) Modèle de Singer et Nicholson publié en 1972 représentant un mix de lipides et de protéines diffusant à la surface des feuillettes de la membrane.
- (C) Modèle de Singer et Nicholson adapté par Englemann illustrant différents types de protéines (transporteurs, transmembranaires ...) qui correspond à la vision actuelle de son architecture.

Figure provenant de (Goñi, 2014); (H. M. Kim et al., 2007)

La comparaison entre les résultats obtenus avec lauridan et c-lauridan, montre que ce dernier, qui localise parfaitement avec GM1 (un marqueur de radeaux lipidiques), est plus approprié pour l'étude des regroupements lipidiques dans la cellule (H. M. Kim et al., 2007).

La reconstitution des radeaux lipidiques *in vitro* est possible en présence notamment de cholestérol, de sphingomyéline et de PC (Dietrich et al., 2001). Pour identifier la présence de ce dernier, le recours à un composé nommé «1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine» (POPC), un produit qui se lie à la bicouche lipidique sur une large plage de température et qui se comporte comme PC, a été utilisé (Sezgin et al., 2015). Pour l'étude des radeaux lipidiques et de leur composition, l'utilisation de toxines, virus ou bactéries a également été proposée (Chazal & Gerlier, 2003). Le regroupement local de ces lipides en nanodomaine joue un rôle de l'activation de la cascade de signalisation PI3K/Akt (Lasserre et al., 2008)

Les regroupements lipidiques, peu nombreux dans les cellules pancréatiques au repos, augmentent en présence de glucose (stimulation) suggérant ainsi que l'activité de la cellule influence l'organisation de la membrane en radeaux lipidiques (Sezgin et al., 2015).

En définitive, ces microdomaines (Figure 10), composés de phospholipides, de sphingomyéline et de cholestérol, agissant comme des plateformes rigides (liées à la présence du cholestérol) ne sont pas simples à mettre en évidence car les méthodes biochimiques peuvent créer ou détruire des structures (traitement détergent, effet de température) et que les études classiques en microscopie optique à fluorescence ne sont pas adaptées puisque la taille de ces microdomaines est inférieure à la limite de résolution (200 nm, (Papahadjopoulos et al., 1973)). Ces difficultés techniques sont à l'origine de la controverse sur l'existence des rafts. Elles ne remettent pas en cause la capacité de ces éléments à interagir ensemble mais ne permettent pas de prouver que ces regroupements se produisent *in vivo*.

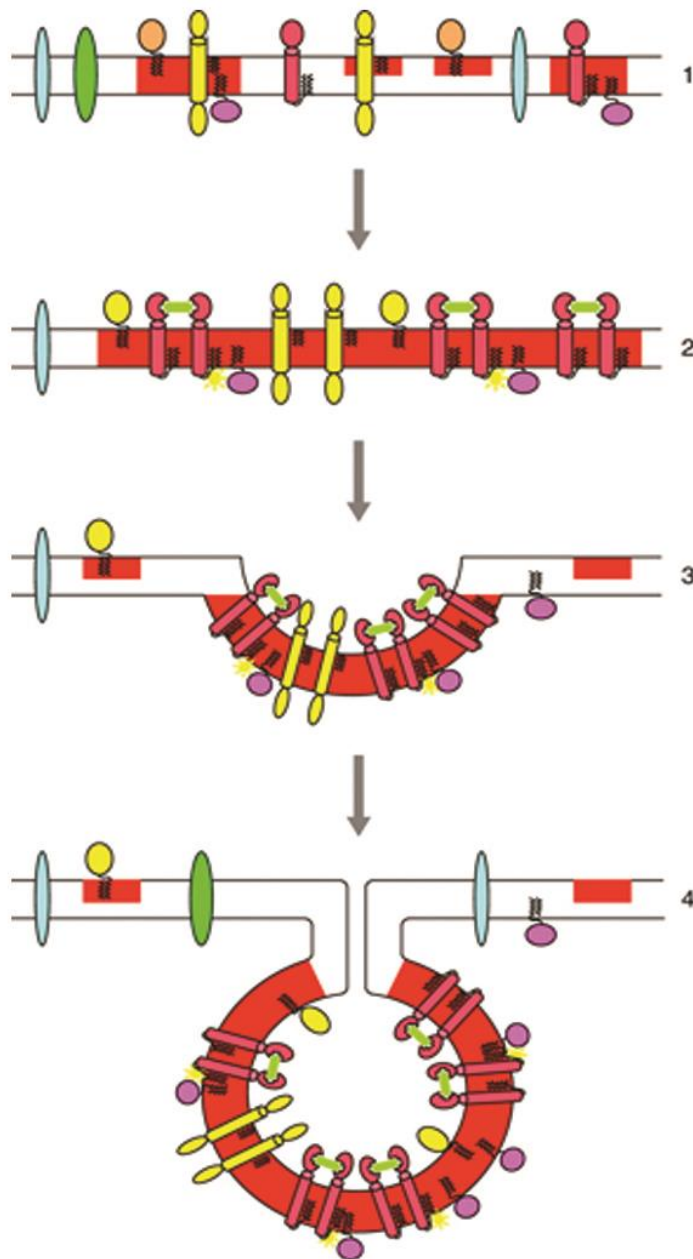


Figure 10: Les radeaux lipidiques et leur potentiel rôle dans la formation des vésicules d'endocytose

Le schéma représente les différentes étapes nécessaires pour la formation d'un radeau lipidique qui pourrait conduire à la formation de la vésicule.

- (1) Présence d'éléments lipides/protéines diffusant librement dans la bicouche lipidique.
- (2) Association des protéines et des lipides formant le radeau lipidique.
- (3) Formation d'une invagination par encombrement stérique liée aux interactions.
- (4) Création d'une vésicule mature pouvant servir à l'endocytose d'un cargo

Référence : (Schlame & Greenberg, 2016) ; (Simons & Sampaio, 2011)

c. Les feuillets

La bicouche lipidique de la membrane plasmique est composée de deux feuillets : l'un interne (face cytosolique) et l'autre externe (face extérieur de la cellule). La composition de ces deux feuillets est différente. Le feuillet interne est constitué majoritairement de phosphatidylsérines (PS), phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphoinositides (PI) en faibles proportions alors que le feuillet externe contient surtout de la sphingomyéline et de la phosphatidylcholine. Le cholestérol est réparti entre les deux feuillets. La composition en lipides des feuillets de la membrane permet également à d'autres fonctions biologiques de prendre place. Pour ne citer qu'un exemple, je prendrai celui des phosphatidylsérines qui sont essentiellement présentes sur la face cytosolique. Le signal d'apoptose conduit à une modification de la répartition des phosphatidylsérines dans la bicouche lipidique de la cellule et permet l'élimination de la cellule par les phagocytes produisant un signal d'apoptose (mort cellulaire programmée, (J F R Kerr, 1972)). Cela permet la destruction de cette cellule et à l'endocytose compensatrice ((Segawa et al., 2014), (Ory et al., 2013)).

d. Composition des membranes des organelles

Les membranes étant des barrières protectrices, les communications intracellulaires nécessitent l'établissement d'un système dédié tel que le trafic des vésicules.

Les membranes sont composées de glycérophospholipides (Figure 8) : PC, PS, PE, PA, PI (Phosphatidylinositol) représentant près de 70% du contenu de la membrane mais aussi de sphingolipides (dérivés de ceramides, riches en sphingomyéline) et de stérols (cholestérol) correspondant aux 30% restant. La composition des membranes est différente d'un compartiment à un autre (Le Roy & Wrana, 2005). La cardiolipine est présente quasi-exclusivement dans les membranes des mitochondries et l'acide lysobisphosphatidique dans celles des lysosomes ((Schlame & Greenberg, 2016), (Poorthuis & Hostetler, 1976)). Ces spécificités des compartiments seraient liées à des fonctions biologiques spécifiques de ces

organelles (Poorthuis & Hostetler, 1976). Une illustration de ces différentes compositions en phospholipides est présentée dans la revue de Leventis et Grinstein (Leventis & Grinstein, 2010).

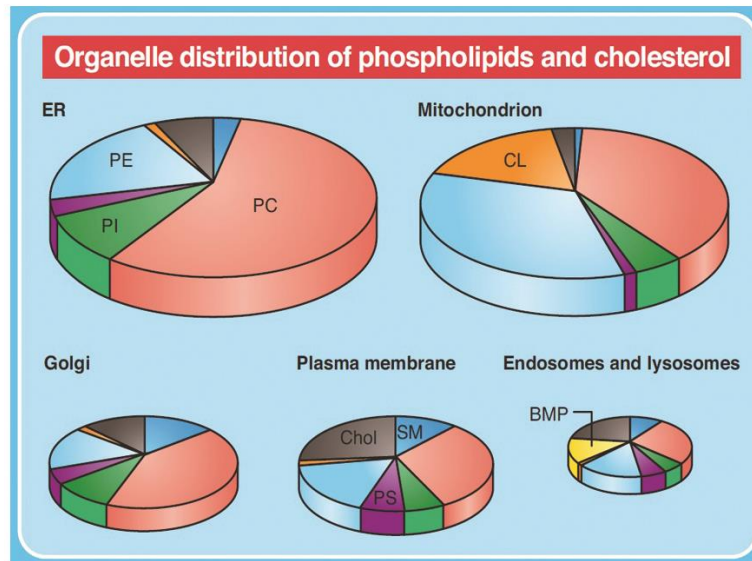
e. Structure biophysique des lipides dans les membranes

La structure générale des glycérophospholipides repose sur une unité nommée l'acide phosphatidique qui est connu pour son rôle de second messager. Il est composé de glycérol et d'acides gras. Pour constituer un glycérophospholipides à partir d'un acide phosphatidique, il faut y ajouter un alcool (Serine pour PS, Ethanolamine pour PE, Choline pour PC, Inositol pour PI). Ce sont les propriétés physico-chimiques de ces glycérophospholipides qui confèrent le caractère amphipathique à ces derniers (hydrophobie provenant des acides gras).

f. Action des modifications lipidiques sur les courbures des membranes

J'ai choisi de me restreindre aux protéines qui jouent sur la répartition des lipides à la membrane. Pour illustrer le fonctionnement de ces protéines qui modifient la composition lipidique ou sa répartition dans la bicouche lipidique, je présenterai brièvement un exemple de chaque catégorie de protéines. La création d'une vésicule à partir de la membrane plasmique nécessite la déformation de la bicouche lipidique, sa scission et sa migration à l'intérieur de la cellule. Ces étapes peuvent être facilitées par les lipides agissant directement sur les courbures en recrutant des protéines via les phosphoinositides et/ou par les protéines courbant la membrane telles que la dynamine et l'actine comme nous le verrons dans les parties dédiées à ces protéines.

A



B

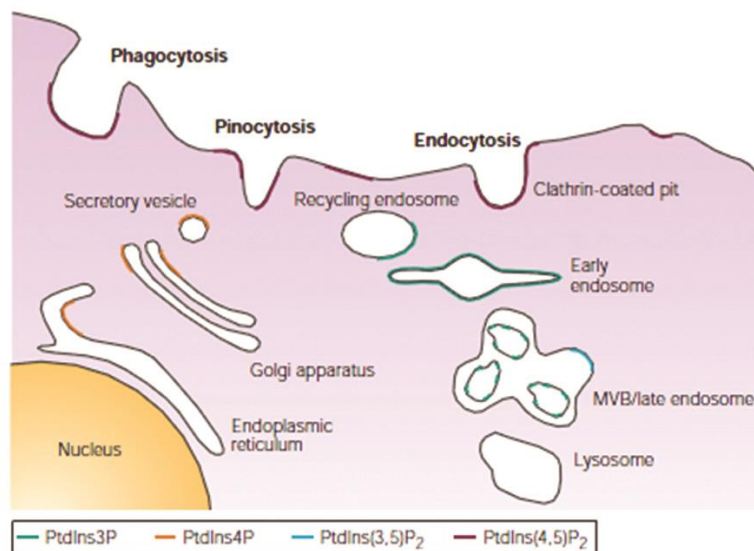


Figure 11: Composition des membranes de la cellule chez les mammifères

(A) Camembert représentant les répartitions en phospholipides et en cholestérol dans les différents compartiments de la cellule chez les mammifères.

(B) Schéma illustrant les compartiments cellulaires où les différents phosphoinositides sont présents.

Référence : (Jenkins & Frohman, 2005) ; (Le Roy & Wrana, 2005), (van Meer & de Kroon, 2011) ; (M.-S. Yoon, Du, Backer, Frohman, & Chen, 2011)

1. Phospholipases A, B, C, D

Les protéines de la classe des phospholipases sont capables de courber les membranes par une modification de la composition de la bicouche lipidique. En effet, ces enzymes peuvent couper en un site précis les chaînes composant les phospholipides. Les phospholipases A, B, C et D ont chacune un site d'action spécifique. La phospholipase D hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (PA) et en choline. L'accumulation de PA peut conduire à la déformation de la membrane plasmique créant ainsi une courbure pouvant faciliter la formation de vésicules (Jenkins & Frohman, 2005).

➤ L'exemple de la phospholipase D : structure et activité

La phospholipase D est composée de deux domaines importants pour la liaison avec les membranes, les domaines PX et PH. Il existe deux isoformes nommées PLD1 et PLD2.

L'activité de lipase (coupure des lipides) est stimulée par l'ajout de PI3P sur les cellules et est liée à son domaine PX (M.-S. Yoon et al., 2011). La région N-terminale de la protéine contenant les domaines PX et PH n'est pas impliquée dans l'activité de PLD2 puisque la déplétion de ces domaines n'affecte pas l'activité catalytique *in vitro* ((Colley et al., 1997), (Sung, Altshuller, Morris, & Frohman, 1999a), (Sung, Zhang, Morris, & Frohman, 1999b), (Sciorra et al., 1999)). Afin d'identifier les résidus d'acides aminés permettant à la protéine PLD de se lier aux membranes, la comparaison par alignement de séquence des phospholipase D a mis en évidence trois résidus Arg particulièrement conservés (554, 558 et 563) (Sciorra et al., 1999). Le remplacement de deux de ces positions (554, 558) a conduit à une diminution de l'activité de PLD2 et de sa capacité de liaison au PIP2 (Sciorra et al., 1999).

L'action des phospholipases est liée au rôle des phosphoinositides qui les recrutent à la membrane plasmique. La phospholipase D2 (PLD2) se lie essentiellement au phosphoinositide PI(4,5) P2 (Sciorra et al., 1999).

L'action de ces enzymes peut être en coopération avec d'autres facteurs impliqués dans la formation des courbures membranaires. C'est le cas des phospholipases D1 et D2 qui interagissent directement avec l'actine *in vitro* et *in vivo* comme cela a été démontré par des résultats de co-immunoprécipitation et de colocalisation (S. Lee et al., 2001).

➤ **L'importance de l'acide phosphatidique dans la courbure membranaire**

L'acide phosphatidique (PA) produirait spontanément une courbure négative de la membrane qui pourrait faciliter le recrutement de certaines protéines ((Kooijman et al., 2005), (Putta et al., 2016)). Cette courbure pourrait provenir de la petite taille conique et de la charge du PA, lequel forme localement une sorte de coude conduisant à une déformation de la membrane ((van Meer & Sprong, 2004), (Faraudo & Travesset, 2007)). Le PA pourrait ainsi faciliter l'insertion dans la bicouche de la dynamine, initialement recrutée par le PIP2 (K. N. J. Burger et al., 2000).

Le rôle du PA est controversé dans la littérature. Des modèles du fonctionnement du PA dans la séparation de la vésicule ont été proposés en 2003 ((Kooijman, Chupin, de Kruijff, & Burger, 2003), Figure 12). Les auteurs proposent que l'activité «lysophosphatidic acid acyl transferase» LPAAT modifie la composition membranaire en ajoutant du PA (chargé négativement) et conduit à la formation d'une courbure négative du feuillet interne formant le cou de la vésicule.

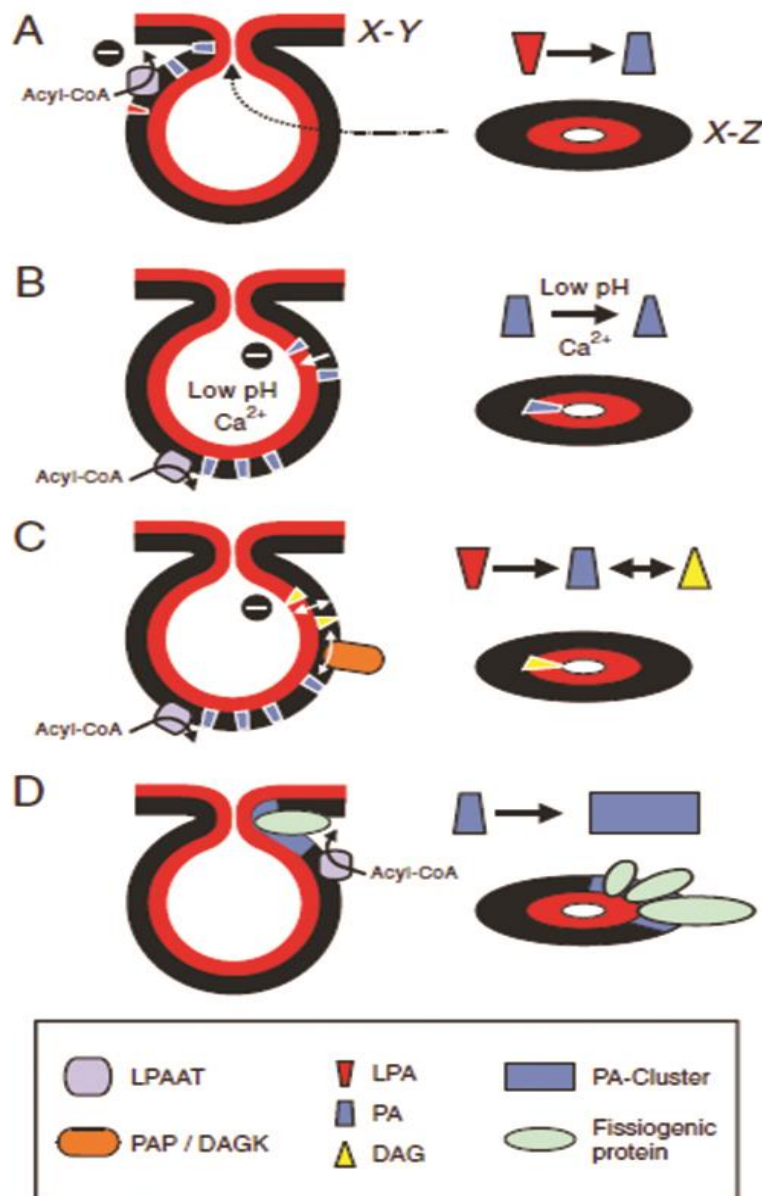


Figure 12: Modèles de la formation de vésicule par l'accumulation locale d'acide phosphatidique

- (A) La déformation de la membrane se produirait spontanément sous l'action de la transformation de LPA en PA
- (B) Courbure membrane négative et spontanée du feuillet interne qui pourrait être impliquée dans la fermeture du cou.
- (C) Conversion rapide de PA en DAG qui est capable de mouvement rapide dans la bicouche et qui induirait spontanément une courbure négative.
- (D) Le regroupement local au cou de la vésicule de PA permettrait le recrutement de protéines telles celui de la dynamine.

Figure de (Kooijman et al., 2003)

Ce regroupement local de PA pourrait servir de plateforme de recrutement de protéines stabilisant la zone du cou de la vésicule jouant ainsi un rôle dans la fission de la vésicule. L'implication du PA a été également suggérée dans le trafic intracellulaire de l'EGFR. Le domaine coiled-coil de CIN85 posséderait un motif capable de reconnaître le PA (J. Zhang et al., 2009).

L'endophiline, une protéine nécessaire à l'entrée du récepteur de l'EGF, aurait une activité enzymatique appelée LPAAT capable de transformer l'acide lysophosphatidique (LPA) en PA ((Huttner & Schmidt, 2000), (Schmidt et al., 1999)). Toutefois, cette fonction de la protéine a été remise en question (Gallop et al., 2005).

En conclusion, l'enrichissement local en acide phosphatidique produit par l'activité enzymatique des phospholipases conduirait à la déformation des membranes.

2. Flippase, floppase, scramblase

Les flippases constituent une famille de protéines responsables de la relocalisation des phospholipides du feuillet externe vers le feuillet interne. Ce mécanisme nécessite de l'énergie (ATP). Par exemple, la flippase ATP11C est une protéine transmembranaire qui permet aux phospholipides PS d'être positionnés sur le feuillet interne de la bicouche lipidique. Lorsque le signal d'apoptose est activé, cette flippase est inhibée ce qui conduit à l'équilibre du PS et donc à l'exposition de PS dans le feuillet externe (Segawa et al., 2014).

Les floppases constituent une famille de protéines responsables de la relocalisation du phosphoinositide du feuillet interne vers le feuillet externe. Leur action qui requière également de l'ATP, est donc opposée à celle des flippases.

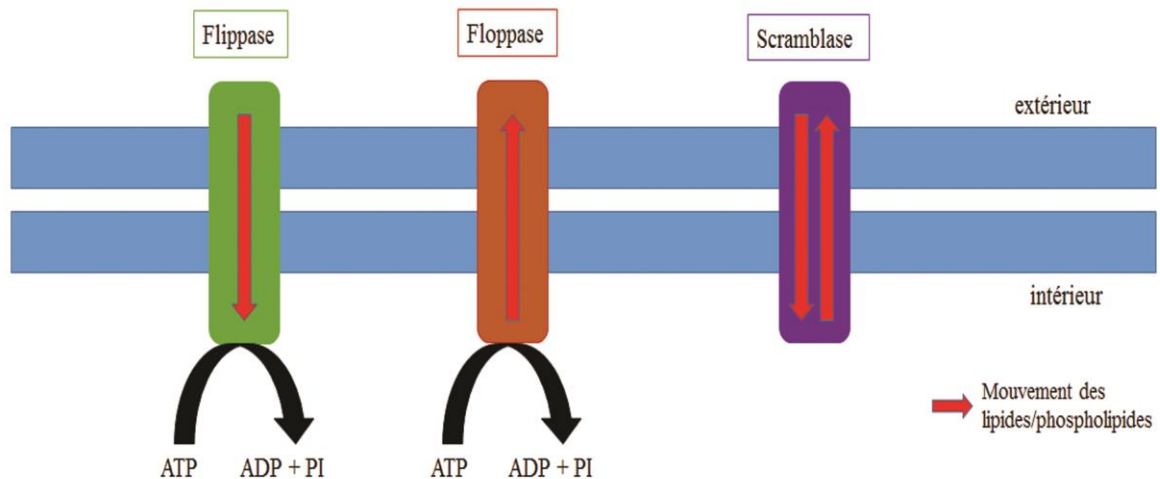


Figure 13 : Mode d'action des flippases, floppases et scramblases

La flippase et la floppase sont des protéines transmembranaires qui nécessitent de l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi.

La flippase permet de déplacer des lipides et/ou phospholipides du feuillet extracellulaire vers le feuillet intracellulaire. En revanche, la floppase conduit au basculement dans l'autre sens (interne vers externe).

La scramblase n'utilise pas d'énergie pour fonctionner. Elle échange un lipide ou un phospholipide simultanément d'un feuillet vers l'autre et inversement.

Le changement de position des phospholipides composant la membrane peut conduire à un enrichissement local, conduisant à de petites structures protrusives, à moduler les forces de tensions, au recrutement de protéines qui courbent les membranes ((Devaux et al., 2008), (van Meer & Sprong, 2004)).

Les scramblases sont des protéines transmembranaires qui permettent d'échanger par flip-flop deux phospholipides présents sur deux feuilletts différents. Ce mécanisme est dépendant du calcium (Ca^{2+}). L'alignement de la séquence codant pour la scramblase murine et humaine a mis en évidence la présence d'un motif de 12 résidus d'acides aminés **D(A/S)DNFGIQFPLD** dont la mutation d'un des résidus d'acides aminés conduit à la perte de l'activité scramblase (Zhou, Sims, & Wiedmer, 1998). Ce processus est, en revanche, indépendant de l'ATP.

iii. Le cytosquelette d'actine

En 1942, l'existence des deux formes G (globulaire) et F (filamenteuse) de l'actine était déjà connue (Straub, 1942). Straub *et al* ont proposé que chaque molécule d'actine contiendrait une à deux molécule(s) d'ATP (Straub & Feuer, 1950). Leur étude a montré que la polymérisation de l'actine était accompagnée d'une diminution du nombre de molécules d'ATP. Par un système de dialyse pour différencier l'ATP du phosphate inorganique, ils ont observé que l'ATP consommé était pratiquement équivalent au phosphate inorganique produit lors du processus de polymérisation (ratio : 1,18, (Straub & Feuer, 1950)). Ils ont suggéré également que le processus de polymérisation et celui de dépolymérisation de l'actine étaient réversibles.

➤ **L'actine câblée**

La polymérisation de l'actine commence par une étape de nucléation correspondant à l'oligomérisation des unités d'actine G. Puis l'élongation et l'assemblage conduisent à la formation de filaments d'actine F.

La fascine, la fimbrine, l' α -actinine, la spectrine, la filamine et la dystrophine font partie de la famille des « F-actin bundle proteins » qui regroupent les filaments d'actine F en faisceaux. Dans les années 1980, l'identification d'une nouvelle protéine de 55 kDa (la fascine) a montré la présence de faisceaux compacts et denses aux électrons en microscopie électronique présents essentiellement dans les fibres de stress dont le marquage est superposable avec celui de l'actine (Yamashiro-Matsumura & Matsumura, 1985).

➤ **L'actine branchée**

L'actine branchée peut s'assembler spontanément dans les cellules (A. E. Carlsson, 2010). Cette action n'est pas favorisée puisque l'assemblage nécessite de l'énergie. C'est pourquoi les nucléateurs qui initient la formation de ces branches sont indispensables. Il en existe plusieurs types dont le complexe Arp2/3 qui permet la formation de branches d'actine et qui est impliqué dans des mécanismes physiologiques comme l'endocytose (voir section II.).

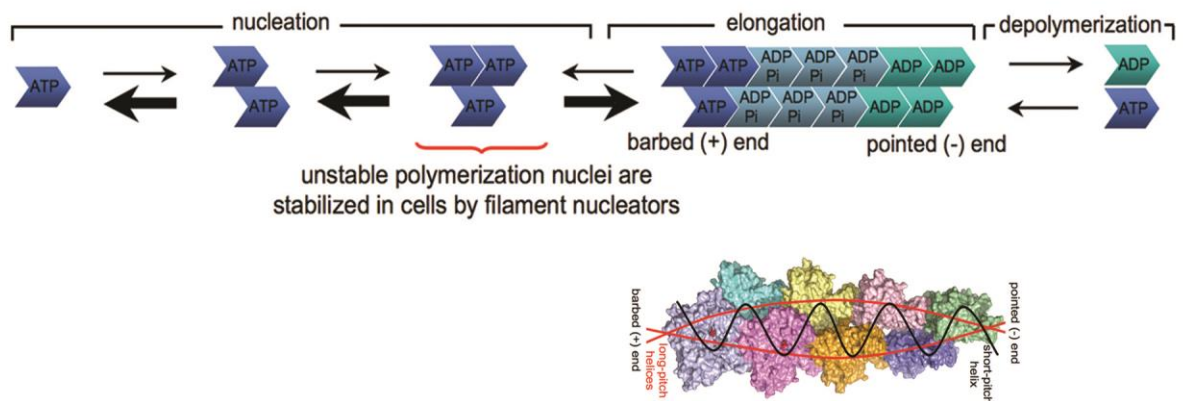


Figure 14 : La formation des filaments d'actine

Cela se produit en deux étapes. La première correspond à la nucléation qui conduit à la stabilisation des unités d'actine. La seconde est l'élongation permettant de polymériser le filament et de le polariser (« barbed end » chargé positivement et « pointed end » chargé négativement). La dépoléarisation est l'opération de déstructuration du filament.

Référence : (Dominguez, 2009) ; (Wu, Suetsugu, Cooper, Takenawa, & Guan, 2004)

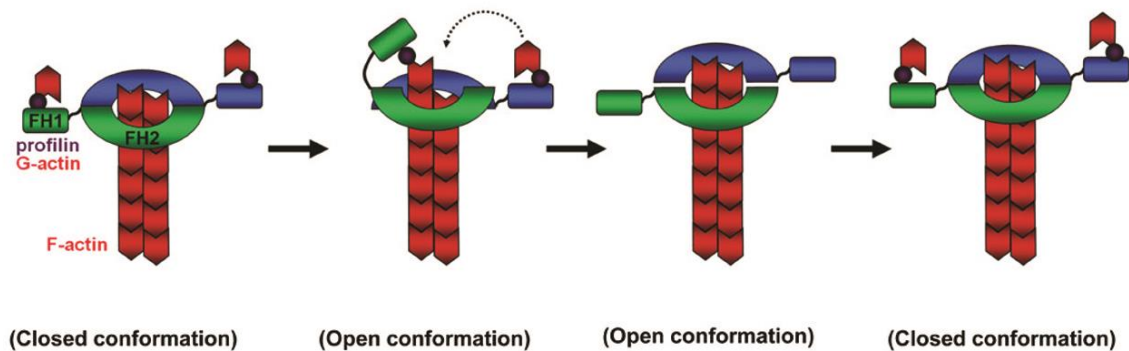


Figure 15: Formation de l'actine câblée

Les formines sont composées d'un domaine FH1 et FH2. Le domaine FH1 est enrichi en proline et est capable de se lier à la profiline dont le rôle consiste à activer les unités d'actine par échange d'un ADP pour un ATP. L'actine ainsi activée permet la polymérisation au niveau de la formine. Quant au domaine FH2, il est également impliqué dans la polymérisation de l'actine.

Référence : (Campellone & Welch, 2010) ; (Wu et al., 2004)

➤ **Les facteurs régulant la polymérisation de l'actine**

Les « nucleation proteins factor » NPF sont classifiés en deux catégories en fonction du type d'actine reconnu, forme monomérique pour la classe 1 (N-WASP, WAVE) et filaments pour la classe 2 (cortactine).

La régulation de l'actine se fait par le recrutement direct ou indirect d'un nucléateur (N-WASP) ou par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation). La protéine « Focal adhesion Kinase » FAK interagit avec N-WASP phosphoryle celle-ci sur le résidu Tyr 256, conduisant à une modification de sa localisation (Wu et al., 2004). La protéine CDC42 active alors N-WASP phosphorylée par FAK qui quitte le noyau pour aller dans le cytoplasme (Wu et al., 2004).

L'actine déforme les membranes par un système d'adhésion à la membrane et de formation d'un réseau de filaments branchés permettant d'exercer une force de traction sur la membrane vers l'intérieur ou vers l'extérieur en fonction des nucléateurs associés. Lors de mécanismes physiologiques, ce sont donc des forces de tension qui permettent la déformation des membranes tels que la formation des filopodes et des lamellipodes (Krause & Gautreau, 2014).

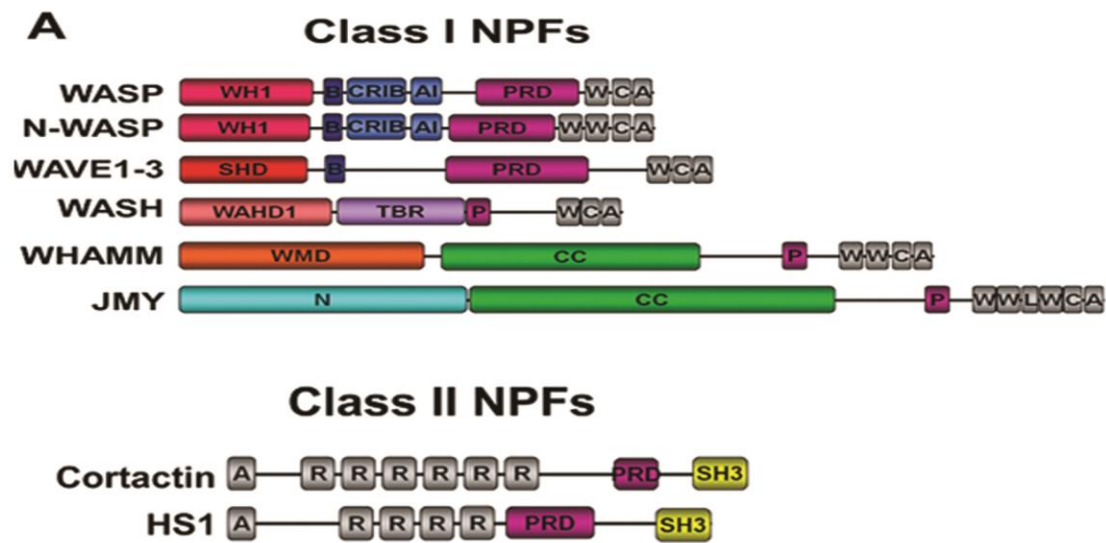


Figure 16: Les deux familles de "nucleation promoting factor" (NPF)

La première classe correspond à des protéines qui se lient aux unités d'actine alors que la seconde reconnaît les filaments.

Figure de (Campellone & Welch, 2010) ; (Faelber et al., 2011)

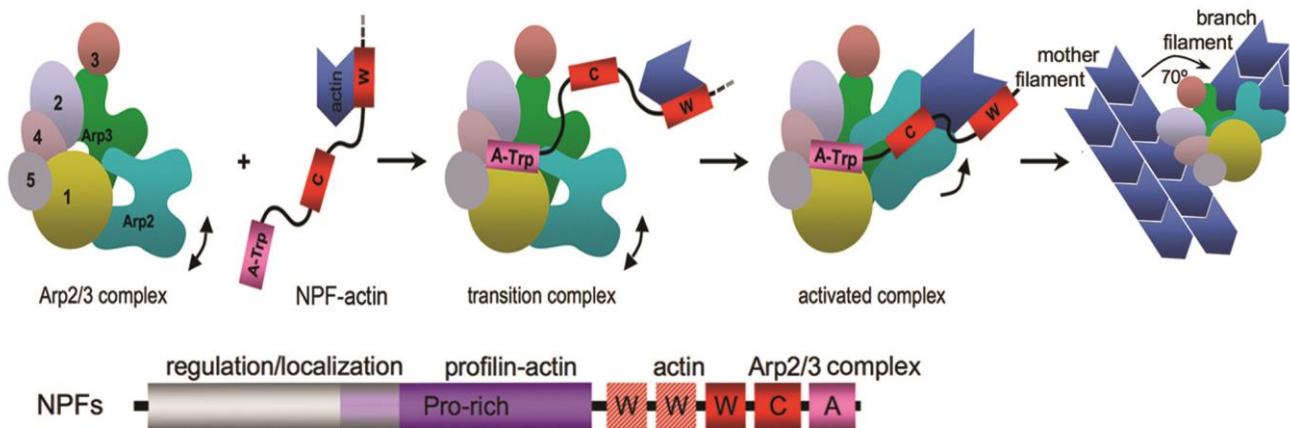


Figure 17: Formation de l'actine branchée par Arp2/3

Le complexe Arp2/3 permet de produire des filaments d'actines attachés au filament « mère » avec un angle de 70°

Figure de (Dominguez, 2009) ; (Vallis, Wigge, Marks, Evans, & McMahon, 1999)

iv. Les dynamines

➤ Structure de la dynamine

La structure des cristaux de la dynamine, une protéine de 100 kDa, a été publiée récemment (Faelber et al., 2011). La dynamine est divisée en 5 domaines nommés **G** (contenant l'activité GTPase), **middle**, « Pleckstrin Homology » **PH**, « GTPase effector domain » **GED**, et « Proline Rich domain » **PRD** (Faelber et al., 2011). La liaison entre les domaines est assurée par les « Bundle signalling Element » (BSE) (Figure 17).

Le domaine PRD confère la capacité d'interagir avec des protéines possédant un domaine SH3 telle que l'endophiline. Le domaine PH reconnaît le phosphoinositide PIP2 et l'acide phosphatidique (PA) et conduit à la liaison de la protéine à la membrane ((TIMM et al., 1994), (Vallis et al., 1999), (K. N. K. Burger et al., 2000) et (Salim et al., 1996)).

➤ Les différentes isoformes de la dynamine

Il existe 25 isoformes de la dynamine (8, 4 et 13 isoformes pour les dynamines 1, 2 et 3). Ces isoformes ne sont pas exprimées uniformément dans les cellules et n'ont pas les mêmes localisations ni probablement les mêmes fonctions (Cao et al., 1998).

➤ Reconnaissance des courbures par la dynamine

Un outil basé sur la liaison covalente à un résidu Cys d'une molécule fluorescente, le « nitrobenzoxadiazole » NBD, a été développé (Ramachandran & Schmid, 2008). Ce fluorophore, couplé à la dynamine, confirme que cette dernière reconnaît bien spécifiquement le PIP2 contenu dans les liposomes (Ramachandran & Schmid, 2008). La dynamine se lie préférentiellement *in vitro* aux liposomes de petite taille (100 nm), voire de taille moyenne (400 nm), plutôt qu'à ceux de grande taille (1000 nm) (Ramachandran & Schmid, 2008). La liaison

est donc sensible au degré de courbure de la membrane avec une affinité supérieure pour les membranes fortement courbées.

➤ **Importance de l'activité GTPase**

Le traitement à la protéinase K en absence ou en présence de GTP montre que la dynamine existe sous deux conformations, liée au GDP ou au GTP (Solomaha & Palfrey, 2005). L'activité GTPasique de la dynamine est variable d'une isoforme à une autre ainsi que d'une structure quaternaire à une autre. En effet, l'activité de la dynamine 2 tétramérique (37,7 nmol /mg/min) est dix fois plus forte que celle de la dynamine 1 tétramérique (3,1 nmol/mg/min) (Solomaha & Palfrey, 2005). L'oligomérisation de la dynamine 2 augmente l'activité GTPasique de cette dernière (113,5 nmol /mg/min) tout comme celle de la dynamine 1 (115 nmol/mg/min) (Solomaha & Palfrey, 2005).

➤ **Oligomérisation de la dynamine**

Les données de cristallographie ont permis une meilleure compréhension de la structure atomique de cette protéine et de la manière dont elle s'assemble (homodimérisation). Elle est capable de former une structure en anneau autour du cou de la vésicule et donne l'impression d'avoir trois niveaux d'anneaux concentriques construits par les domaines PH, BSE et GTPase (du plus proche de la membrane au plus éloigné ((Ford et al., 2011), (Faelber et al., 2011), Figure 19)). Puis, la dynamine continue à s'oligomériser pour former de nouveaux anneaux autour de ce cou qui interagissent aussi entre couches en dimérisant créant ainsi plusieurs tours ((Ford et al., 2011), (Faelber et al., 2011)). Cela forme un complexe qui conduit à la constriction du cou de la vésicule par la torsion créée, puis à la séparation de cette dernière de la membrane plasmique. L'intérieur de l'anneau forme un tube par superposition des couches qui a un diamètre de 80 Å et impliquerait une dizaine de molécules (Ford et al., 2011).

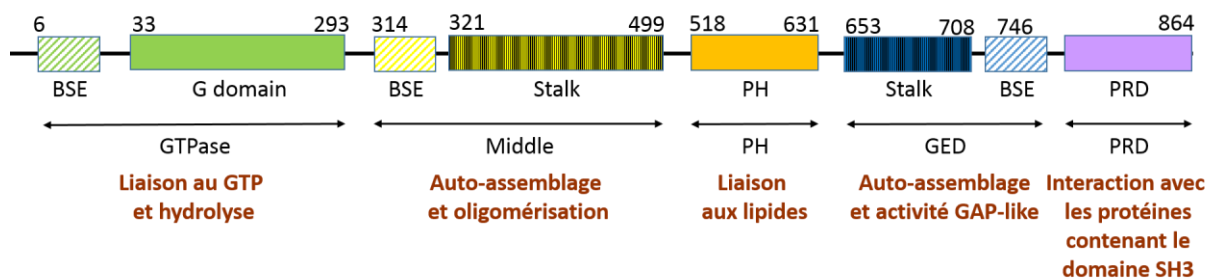


Figure 18: Structure de la dynamine 2

La dynamine possède cinq domaines importants pour sa fonction. L'activité GTPase est impliquée dans la fission de la vésicule. Middle et GED permettent la formation de la forme oligomérisée de la dynamine conduisant à la structure en hélice. PH est requis pour l'interaction avec les phosphoinositides de la bicouche lipidique. Pour finir, PRD permet à la dynamine d'interagir avec d'autres protéines telles que les endophilines.

Figure inspirée de (Faelber et al., 2011) et (Chappie, Acharya, Leonard, Schmid, & Dyda, 2010))

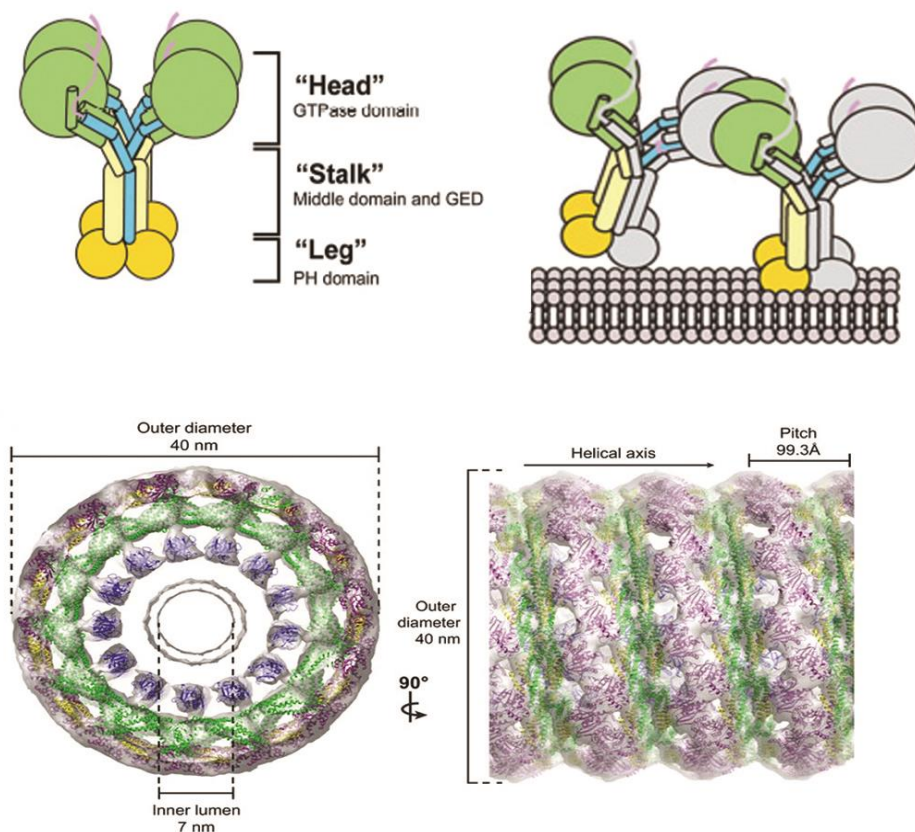


Figure 19: Oligomérisation de la dynamine 2 pour former une structure en hélice

L'image en haut à gauche montre la structure en trois dimensions qui interagit avec les membranes via le domaine PH et avec d'autres unités de dynamine 2 via le domaine GTPase (image en haut à droite) pour former une hélice (image en bas). L'oligomérisation en hélice produit une structure d'un diamètre interne de 7nm qui correspond in vivo à la taille du cou de la vésicule formée par la dynamine 2. ((Chappie & Dyda, 2013), (Chappie, Acharya, Leonard, Schmid, & Dyda, 2010))

➤ **Aspect moléculaire**

Le nombre de molécules impliquées dans la formation des anneaux de dynamine a été réévalué à l'aide de deux nouvelles approches. La première technique est l'édition du génome des cellules. Pour cela, la séquence codant la GFP a été ajoutée directement dans le génome pour exprimer une dynamine-GFP dont la production est contrôlée de manière endogène. La seconde est le « single molecule tracking » qui consiste à suivre une protéine dans le temps et l'espace et de définir le nombre de molécules impliquées en fonction de l'intensité de fluorescence émise par l'objet suivi. La combinaison de ces deux technologies est indispensable pour déterminer l'intensité de fluorescence émise par une seule molécule. Il faudrait donc en moyenne 26 molécules de dynamine pour former un tour et 44 et 77 molécules pour former respectivement deux et trois tours autour du cou d'une vésicule à clathrine ((Grassart et al., 2014), Figure 18 et 19).

En conclusion, la dynamine déforme les membranes par liaison de son domaine PH et par son activité de constriction.

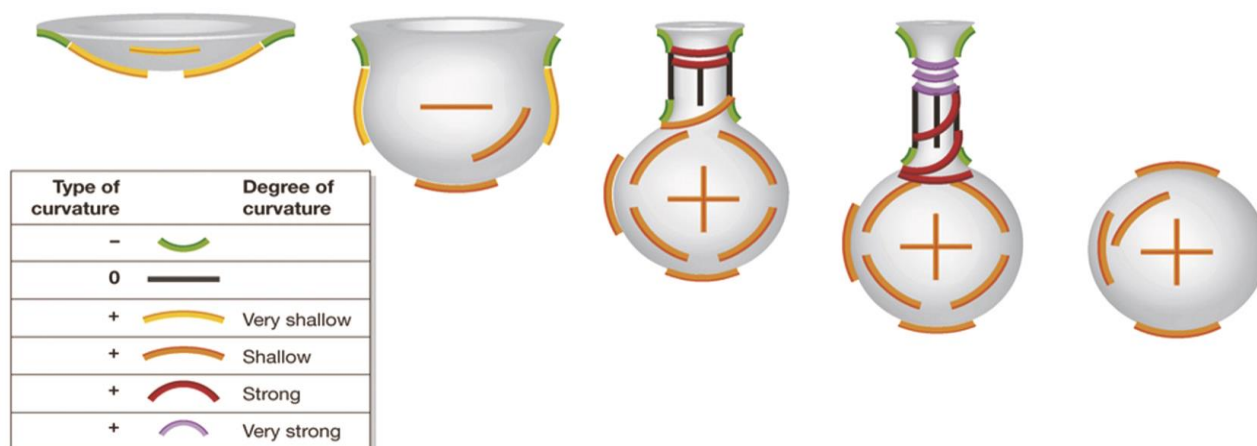


Figure 20 : Les différents types de courbures permettant la formation de la vésicule d'endocytose

Au cours de l'endocytose, la production d'une vésicule est réalisée pour envelopper le ou les éléments à internaliser. Dans un premier temps, des forces vont s'exercer pour déformer les membranes. Différents types de courbures sont nécessaires (positive de faible intensité, positive de forte intensité ou négative). Pour commencer, la membrane doit être courbée pour que l'invagination apparaisse et sculpte la membrane en forme de vésicule en U (image 1 et 2 de gauche à droite). Ces étapes requièrent des protéines courbant faiblement les membranes telles que les protéines à domaine F-BAR. En revanche, la formation du cou de la vésicule est régie par des protéines de fortes courbures (N-BAR) pour que la scission puisse ensuite se réaliser.

Figure de (Qualmann et al., 2011)

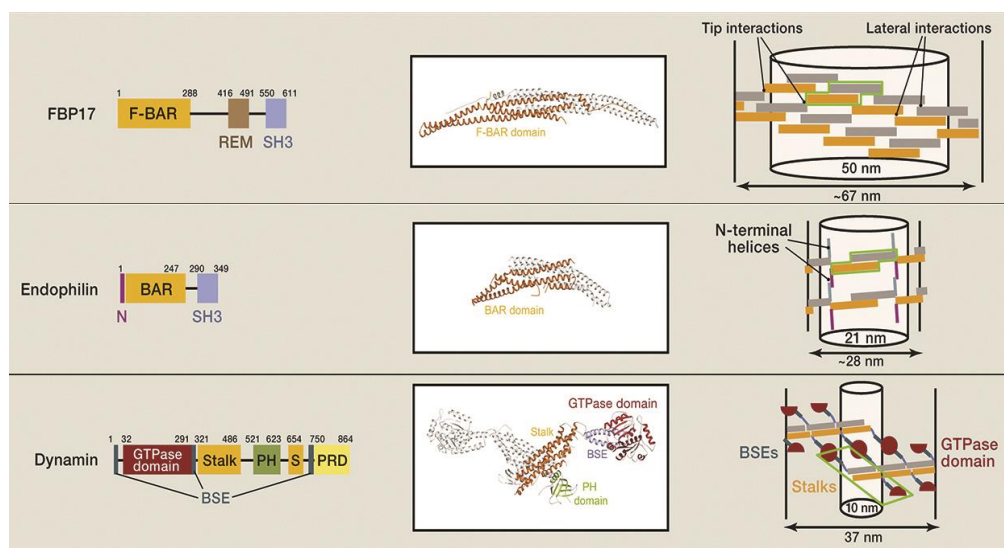


Figure 21 : Les protéines pouvant conduire à la formation d'une hélice

La dynamine 2 peut former une hélice dont le diamètre est de 7 à 10 nm. D'autres protéines à domaine BAR seraient également capables de produire ce type de structure dont le diamètre interne serait plus grand tel que l'endophiline (21 nm).

Figure modifiée de (Daumke et al., 2014)

En conclusion, différents mécanismes permettent la déformation des membranes. Parmi eux, les protéines courbant les membranes telles que celles à domaine ANTH, ENTH, BAR, ou à motif ALPS sont les plus connus. D'autres, comme la dynamine ou celles liées à des modifications lipidiques et à l'actine sont également essentielles notamment pour la formation de vésicules qu'elles soient recouvertes ou non d'un manteau (COP I, COP II, clathrine, cavéoline). Le schéma ci-dessous illustre l'importance de ces courbures dans la production de vésicules d'endocytose et la fermeture du cou de la vésicule. Dernièrement, il a été proposé que les endophilines puissent former des hélices comme la dynamine (Figure 21) et avoir une action commune dans l'étape de la formation du cou des vésicules.

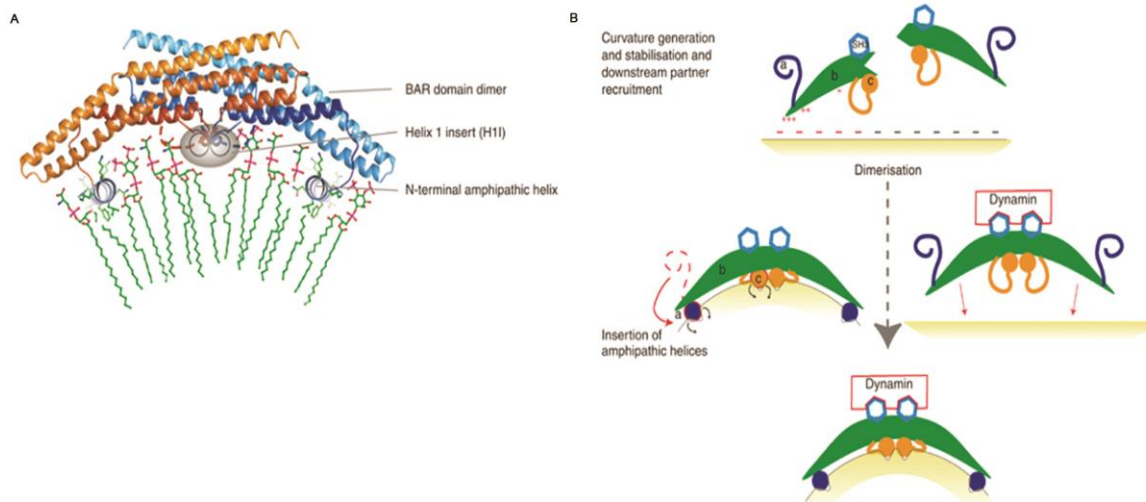


Figure 22 : Interaction de l'endophiline A2 avec la dynamine 2

- (A) L'hélice amphipathique (N-ter) et H1 de l'endophiline s'insèrent dans la bicouche et entraîne une déformation de la membrane.
- (B) L'endophiline a une conformation différente lorsqu'elle est liée ou non avec les membranes. La dynamine interagit avec les domaines SH3 des endophilines pour former un complexe courbe les membranes.
- Référence : (Gallop et al., 2006)

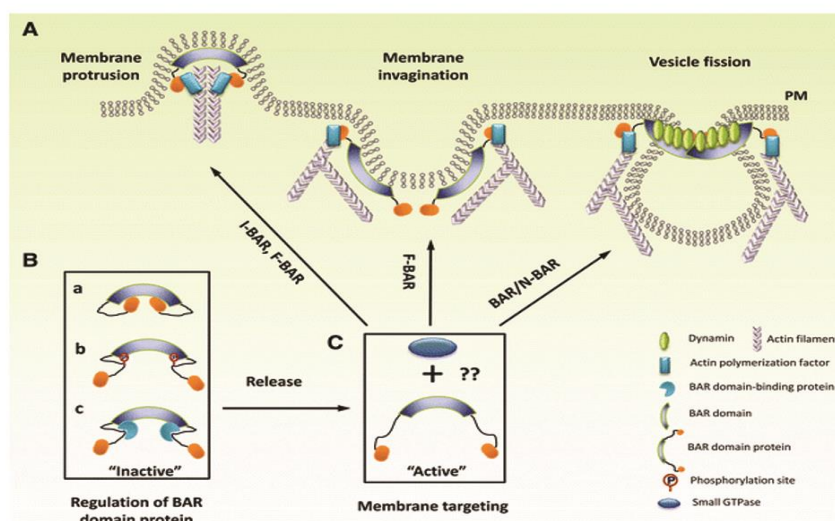


Figure 23 : Proposition d'action coopérative entre les différentes protéines impliquées dans la courbure membranaire

La production de vésicules peut provenir soit d'une protrusion, soit d'une invagination. L'action coordonnée de protéines à domaine BAR, de la dynamine et de l'actine pourrait être requise pour former le cou et induire la scission de la vésicule.

Référence : (Rao & Haucke, 2011)

II. Rôles des protéines courbant les membranes dans les voies d'endocytose

Les cellules eucaryotes sont constituées d'un système endomembranaire correspondant à différentes membranes qui échangent des protéines ou des signaux entre elles sous la forme de vésicules et qui communiquent avec l'environnement extérieur. La membrane plasmique enveloppe la cellule tandis que d'autres membranes entourent les organelles qui sont des compartiments intracellulaires. L'endocytose est un mécanisme qui permet l'entrée de molécules provenant du milieu extracellulaire via la formation de vésicules au niveau de la membrane plasmique. Ce processus est essentiel dans la physiologie cellulaire notamment pour l'approvisionnement des cellules en nutriments, le maintien de la composition de la membrane plasmique, la réponse aux hormones ou encore la migration cellulaire. Ce mécanisme hautement régulé permet, par exemple, l'extinction de la cascade de signalisation induite par des récepteurs de cytokines comme l'interleukine 2 (IL-2) ((Hémar et al., 1995), (Gesbert et al., 2004)). À ce jour, plusieurs voies d'endocytose peuvent être distinguées en fonction des molécules impliquées et de la taille des vésicules formées (Figure 24, (Mayor & Pagano, 2007)). Dans cette partie, je définirai brièvement les particularités de différentes voies d'endocytose puis, pour chacune d'elles, je m'intéresserai aux protéines qui courbent les membranes. Je développerai plus particulièrement deux de ces voies : la voie d'endocytose dépendante de la clathrine utilisée par la transferrine (voie de référence) et la voie indépendante de la clathrine suivie par des récepteurs de cytokines (objet de mon étude).

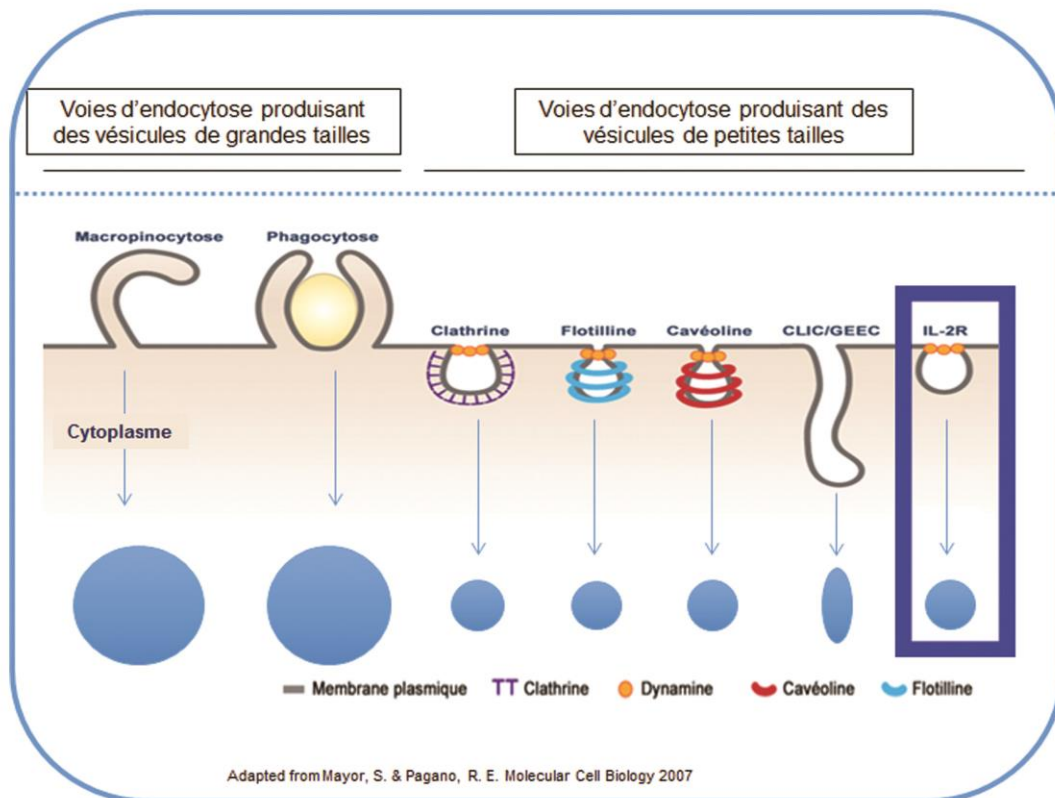


Figure 24 : Les différentes voies d'endocytose

Les voies d'endocytose peuvent être classifiées en deux catégories en fonction de la taille des vésicules formées. La phagocytose et la macropinocytose produisent de grosses vésicules (supérieures à 200nm) alors que la clathrine, la flotilline, la cavéoline, la CLIC/GEEC et l'IL-2R ne conduisent qu'à de petites vésicules (inférieures à 200nm).

Référence : (Mayor & Pagano, 2007)

A. Les voies d'endocytose produisant des vésicules de grandes tailles

L'endocytose à « grande échelle », par opposition à l'endocytose à « petite échelle », regroupe la macropinocytose et la phagocytose (Figure 24) générant des vésicules de 200 nm à 1000 nm.

i. La macropinocytose

a. Présentation

En 1931, Warren Lewis présente pour la première fois une description de la macropinocytose par des critères morphologiques (Lewis, 1931). Cette voie d'internalisation se caractérise par une entrée du fluide extérieur dans la cellule à partir de grosses vésicules formées par un recouvrement actif de la membrane via le recrutement d'actine. Ce processus est inductible par certaines hormones dont l'EGF ou le PDGF. Ce procédé n'est emprunté par aucun récepteur utilisant exclusivement cette voie, ce qui ne facilite pas sa caractérisation. La macropinocytose joue aussi un rôle dans la mobilité cellulaire, dans la présentation d'antigènes par les cellules spécialisées (macrophage, lymphocytes) et dans l'entrée de pathogènes (bactéries ou virus).

b. Les facteurs impliqués dans la courbure de la membrane

1. Les sorting nexines

Les SNX1, SNX5, SNX9, SNX18 et SNX33 sont des protéines à domaine PX-BAR impliquées dans la formation des macropinosomes (J. T. H. Wang et al., 2010). En effet, la surexpression transitoire de ces protéines conduirait à une augmentation du pourcentage de macropinosomes formés (J. T. H. Wang et al., 2010). De plus, les SNX1, SNX5, SNX9 et SNX18 colocalisent partiellement avec le dextran (marqueur du fluide extérieur), cinq minutes après son entrée (J. T. H. Wang et al., 2010).

2. L'actine

L'actine joue un rôle prépondérant dans la macropinocytose (E. Lee & Knecht, 2002). Elle enveloppe le macropinosome au cours de sa formation (E. Lee & Knecht, 2002).

3. La protéine CtBP1/BARS

Il existe deux isoformes de CtBP1/BARS, une courte (CtBP1-S /BARS) et une longue (CtBP1-L/BARS) différentes de 11 résidus d'acides aminés (manquant dans CtBP1-S/BARS). La déplétion simultanée de ces deux isoformes conduit à une diminution drastique du nombre de macropinosomes dans les cellules. L'injection de CtBP1/BARS est suffisante pour restituer le phénotype sauvage (Liberali et al., 2008). Les auteurs de cet article suggèrent un rôle de CtBP1/BARS dans le mécanisme de fission des macropinosomes, un processus indépendant de la dynamine. Lors de la formation du macropinosome, l'actine et CtBP1/BARS sont colocalisés, ces derniers entourant la vésicule en cours de formation (Liberali et al., 2008). Plus précisément, la phosphorylation par PAK1 sur le résidu Ser-147 de CtBP1 est nécessaire pour l'internalisation (Liberali et al., 2008).

ii. La phagocytose

a. Présentation

La phagocytose est une voie d'entrée responsable de l'élimination notamment de cellules mortes, de bactéries et de virus. Des cellules spécialisées dans la réponse immunitaire, telles que les macrophages, vont en premier lieu recouvrir de leur membrane l'élément à éliminer par un mécanisme nécessitant la polymérisation de l'actine. L'internalisation va conduire à la formation d'une grosse vésicule appelée le phagosome dont le contenu sera dégradé après fusion avec des lysosomes, vésicules contenant des enzymes capables de dégrader protéines, sucres, acides nucléiques et lipides. Après digestion, les restes sont libérés et présentés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes conduisant ainsi à la réponse immunitaire.

b. Les facteurs impliqués dans la courbure de la membrane

1. FBP17, une protéine F-BAR

La protéine FBP17 est impliquée dans le processus de phagocytose (Tsuboi et al., 2009). En effet, le marquage à la phalloïdine a montré que l'actine est colocalisée avec FBP17 au niveau

du podosome (Tsuboi et al., 2009). FBP17 joue un rôle dans la formation du podosome (extension membranaire, (Linder, 2005)) qui enveloppera l'élément à éliminer et des phagosomes puisque la déplétion de cette protéine diminue leur présence respectivement d'un facteur 3 et d'un facteur 2 (Tsuboi et al., 2009).

2. Les lipides

Le phosphoinositide PI(3, 4, 5)P3 est présent dans la cellule au niveau de la membrane plasmique des organelles et est recruté au niveau du phagosome lors de la phagocytose (Vieira et al., 2001). Le traitement des cellules par la wortmannine (inhibiteur de la PI3K) conduit à une perte de l'accumulation du PIP3 autour du phagosome et à une réduction du nombre de phagosomes sans affecter la maturation de ces phagosomes (Vieira et al., 2001). VPS34, une protéine appartenant à la classe III des PI3K, est impliquée dans la fusion du phagosome avec le lysosome.

B. Les voies d'endocytose produisant des vésicules de petites tailles avec manteau

L'endocytose à « petite échelle » forme des vésicules dont le diamètre est inférieur à 0.2 μm (Conner & Schmid, 2003). Je présenterai les mécanismes d'endocytose suivants : la voie clathrine (Doherty & McMahon, 2009), la voie des cavéoles, la voie des protéines à ancrage GPI (GEEC/CLIC) et la voie des récepteurs de cytokines qui sont les plus connus.

i. La voie clathrine

La première voie d'endocytose à avoir été identifiée est celle dépendante de la clathrine et est la mieux caractérisée à ce jour. La détermination de l'orchestration de ce mécanisme a permis une meilleure compréhension du rôle des protéines impliquées (Taylor et al., 2011). La voie

dépendante de la clathrine est empruntée par un grand nombre de récepteurs tels que celui de la transferrine.

a. Présentation

L'internalisation médiée par la voie clathrine se déroule en plusieurs étapes. La première est la nucléation qui conduit au recrutement, à la membrane plasmique, de la clathrine pour former un manteau (voir section sur les manteaux). La seconde est la sélection du cargo à endocyter. Les protéines adaptatrices sont recrutées au niveau du manteau reconnaissant les cargos grâce aux motifs présents dans leur séquence polypeptidique. Ensuite, le manteau à clathrine s'assemble et les adaptateurs recrutent d'autres facteurs impliqués dans la formation des vésicules servant également de protéines d'ancrage pour les récepteurs à internaliser. Puis, la fission de la vésicule se produit par la coopération de protéines permettant de serrer le cou de la vésicule jusqu'à sa scission de la membrane par la dynamine. Enfin, l'auxiline démantèle le manteau à clathrine et les vésicules fusionnent ensuite avec les endosomes précoces conduisant au tri des récepteurs vers le recyclage ou la dégradation.

b. Les facteurs impliqués dans la courbure de la membrane

1. Rôle des phospholipides de la membrane plasmique

Une étude a proposé que les phospholipides jouent un rôle dans la déformation des membranes ; l'ajout de certains phospholipides exogènes (PC et PE) sur des cellules (K562) contrairement à PS, a conduit à une augmentation du taux de transferrine internalisée (Farge et al., 1999). D'autre part, les lipides composant la membrane plasmique, tels que les phosphoinositides 4,5 biphosphates (PI(4,5)P₂), agissent en tant que recruteurs de protéines comme l'epsine ou la dynamine ((Boucrot et al., 2012), (K. N. K. Burger et al., 2000)).

2. Les protéines à domaine BAR, ANTH et ENTH

Les protéines courbant les membranes, telles que celles porteuses du domaine ENTH, ANTH ou BAR, ont été impliquées dans plusieurs étapes de la formation de la vésicule à clathrine.

Elles seraient nécessaires aussi bien lors de l'initiation du puits que lors de la formation de la vésicule à clathrine, ou encore pour promouvoir la scission de la vésicule de la membrane plasmique.

FCHO appartient à la famille des protéines à domaine F-BAR et reconnaît spécifiquement le PI(4,5) P2 (Henne et al., 2010). Les protéines FCHO sont nécessaires pour l'endocytose à clathrine (Henne et al., 2010). FCHO2 est recrutée à la membrane plasmique dès la présence de la clathrine, voire même avant (Henne et al., 2010). FCHO est requis précocement et colocalise avec l'intersectine et l'Eps15 (Henne et al., 2010). FCHO1 et FCHO2 sont fortement colocalisées et AP2, un complexe protéique composé de quatre sous unités (α - et β -adaptine, μ et σ) capable de recruter les cargos, grâce à des motifs spécifiques situés sur les récepteurs, et d'autres protéines adaptatrices et échafaudages interagissant avec la clathrine (Henne et al., 2010).

Pour que SNX9, une protéine à domaine BAR, soit fonctionnelle dans la formation de tubules dans la cellule, les domaines « low complex » LC (contenant l'hélice amphipatique), PX et BAR sont requis ; le domaine SH3 n'est pas indispensable pour cette fonction (Shin et al., 2008).

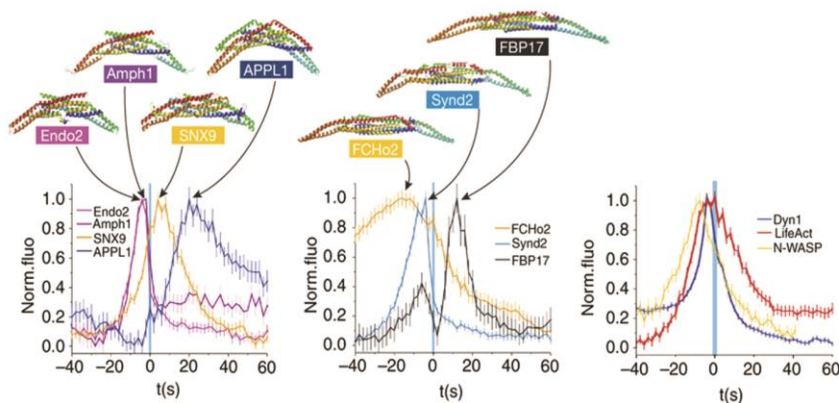


Figure 25: Le recrutement des protéines à domaine BAR dans la voie dépendante de la clathrine. L'orchestration des protéines courbant les membranes dans la voie clathrine a été définie grâce aux profils d'intensités obtenues à partir de films acquis avec un microscope TIRF.

Figure de (Qualmann et al., 2011)

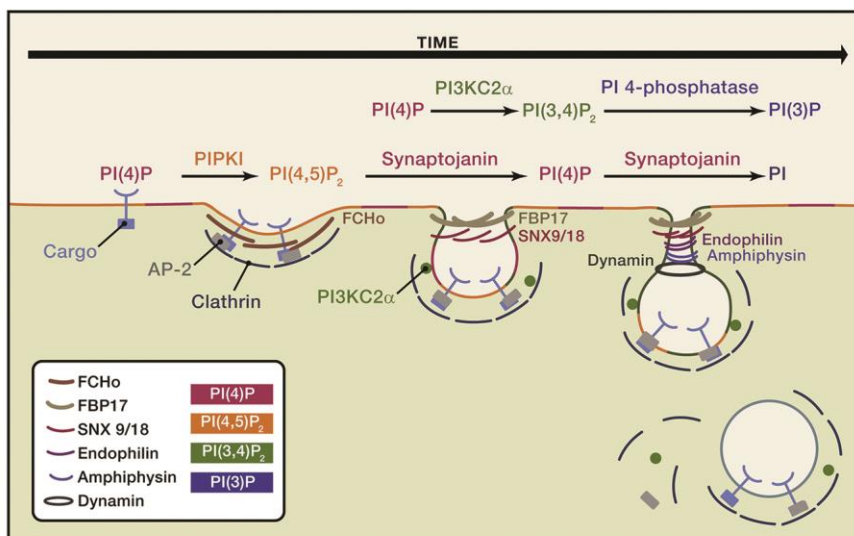


Figure 26 : le recrutement des protéines courbant les membranes dans la formation des vésicules à manteau clathrine. Représentation schématique du recrutement séquentiel des protéines pouvant courber les membranes dans la voie d'endocytose dépendante de la clathrine.

Référence : (Daumke et al., 2014)

3. L'actine

La dynamique de l'actine a été observée à la membrane plasmique en 2002 au moment de l'internalisation du récepteur de la transferrine en utilisant la technique de « Total Internal Reflection Fluorescence » TIRF (Merrifield et al., 2002). L'actine est notamment requise pour la séparation de la vésicule car elle confère au cou de la vésicule une tension supplémentaire facilitant son détachement de la membrane plasmique ((Taylor et al., 2011), (Morlot et al., 2012)). L'actine peut également intervenir au cours de plusieurs étapes de l'endocytose comme le suggère les études réalisées par microscopie à onde évanescente (TIRF), une technique qui restreint la visualisation à la membrane plasmique (Merrifield et al., 2002). N-WASP et Arp3 sont recrutés au moment de la fission de la vésicule, montrant une action conjointe de la dynamine et de l'actine dans le mécanisme de séparation de la vésicule de la membrane plasmique ((Merrifield et al., 2005), (Perrais & Merrifield, 2005)).

L'entrée de la transferrine nécessite la polymérisation d'actine. Le traitement des cellules à la Latrunculine A, une drogue bloquant la polymérisation d'actine, a conduit à une diminution de l'endocytose de la transferrine ainsi qu'à une augmentation du pourcentage de récepteurs à la surface cellulaire (Lamaze et al., 1997). Cependant, l'actine n'est pas nécessaire au regroupement des récepteurs de la transferrine à la membrane plasmique (Lamaze et al., 1997).

4. La dynamine

La dynamine joue un rôle essentiel dans la fission des vésicules de la membrane plasmique. Elle aurait une action de constriction du cou de la vésicule. L'absence de la dynamine, tout comme du domaine PH de cette dernière, affecte également l'endocytose de la transferrine (Vallis et al., 1999). Le dynasore inhibe spécifiquement l'activité GTPase de la dynamine et bloque les vésicules à la membrane plasmique (microscopie électronique) sous forme d'un « o » correspondant à des vésicules totalement formées mais pas détachées de la membrane plasmique (Macia et al., 2006). La dynamine reste donc figée à la membrane plasmique sous

l'action de cette drogue (Macia et al., 2006). La mutation de la dynamine qui remplace l'absence du domaine PH sur la lysine en position 535 (remplacé par l'alanine) montre le même effet inhibiteur sur l'endocytose médiée par la clathrine (Vallis et al., 1999). La déplétion de la dynamine dans les cellules conduit à une massive tubulation de la membrane plasmique au niveau des puits à clathrine comme le montre la reconstitution en trois dimensions d'images prises en microscopie électronique à tomographie (Ferguson et al., 2009). La dynamine est un pivot de ce mécanisme. Elle interagit via son domaine PRD avec le domaine SH3 de la cortactine et colocalise avec cette dernière dans la cellule ((McNiven, 2000), (Cao et al., 2003)). La syndapine est également impliquée dans l'endocytose médiée par la clathrine ((Qualmann & Kelly, 2000), (Sauvonnet, Dujeancourt, & Dautry-Varsat, 2005b)). Elle est capable d'interagir avec N-WASP, la dynamine et la synaptojanine et conduit à une réorganisation de l'actine corticale (Qualmann & Kelly, 2000). En 2005, l'importance de la syndapine, de mAbp1 et de l'intersectine a été montrée (Sauvonnet, Dujeancourt, & Dautry-Varsat, 2005).

5. La synaptojanine

La synaptojanine reconnaît préférentiellement les liposomes de petites tailles (50 nm) contenant du PIP2 (Chang-Ileto et al., 2011). La synaptojanine hydrolyse le PIP2 et est impliquée dans les étapes précoces de l'endocytose médiée par la clathrine (Chang-Ileto et al., 2011). Elle interagit, via le motif CAAX de son domaine carboxyterminal avec Rac1 qui la recrute à la membrane plasmique (Malecz et al., 2000). Elle colocalise aussi avec la dynamine et jouerait un rôle dans la fission et le désassemblage du manteau à clathrine.

6. Forces exercées par le regroupement local des récepteurs

Grace à un ingénieux système utilisant une version du récepteur de la transferrine contenant un peptide accepteur d'une quinzaine de résidus d'acides aminés, le groupe de Sandy Schmid a révélé le regroupement des récepteurs de la transferrine à la membrane plasmique dans les puits

à clathrine (A. P. Liu et al., 2010). Sur des images prises en microscopie électronique, l'accumulation locale de récepteurs de la transferrine est également observée (A. P. Liu et al., 2010). En étudiant la cinétique d'internalisation, les auteurs ont observé que cette concentration de récepteurs permettait une entrée plus rapide de ceux-ci en induisant des forces tirant vers l'intérieur de la cellule et conduisant à la formation de la vésicule (A. P. Liu et al., 2010). Le regroupement local d'éléments tels que celui de récepteurs conduit à un encombrement stérique qui crée donc en soi des forces capable de déformer la membrane (Busch et al., 2015).

7. Rôle coopératif de ces protéines dans la scission de la vésicule

➤ Lien entre l'endophiline et la dynamine

L'endophiline est localisée au niveau du cou de la vésicule tout comme la dynamine sur des coupes de cellules observées en « Transmission Electron Microscopy » (TEM, (Sundborger et al., 2011)).

Le résidu Leu-215 de l'endophiline, situé dans la troisième hélice du domaine BAR, est conservée dans les endophilines A de la souris, de la drosophile et de *C. Elegans* (Gortat et al., 2012). Le remplacement de ce résidu par Ala conduit à la diminution de la dimérisation du domaine BAR et de son interaction avec la dynamine, suggérant un rôle coopératif entre la dynamine et l'endophiline (Gortat et al., 2012). L'action de l'endophiline pourrait faciliter celle de la dynamine (Meinecke et al., 2013). L'endophiline, pouvant se lier à l'actine et à la dynamine, aurait un rôle pivot dans l'endocytose (Itoh et al., 2005). L'endophiline colocalise avec la clathrine dans les cellules. L'absence de dynamine conduit à une augmentation de la présence de l'endophiline cytosolique dans les cellules observées en microscopie à épifluorescence (Ferguson et al., 2009).

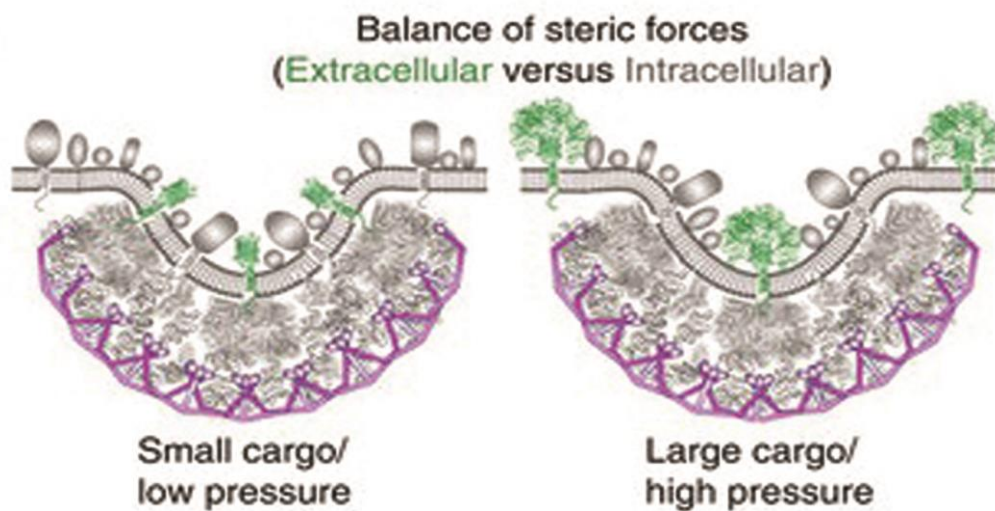


Figure 27: Illustration de l'effet des encombrements stériques sur la courbure des membranes. Le regroupement de cargo de petites tailles exerce une faible tension alors qu'un cargo de grande taille produit une forte force de pression. Cette figure illustre que le cargo pourrait lui aussi participer à la formation de la courbure des membranes et initier l'invagination de la bicouche lipidique. (Busch et al., 2015)

Le domaine PRD de la dynamine est important pour le recrutement ou le rôle de l'endophiline. En effet, la réintroduction de la dynamine sans le domaine PRD dans des cellules déplétées de la dynamine par traitement siRNA ne permet pas de rétablir l'endocytose clathrine dépendante (Ferguson et al., 2009).

Des études *in vitro* suggèrent que l'endophiline augmenterait l'association de la dynamine aux membranes. En effet, la dynamine se lie progressivement aux GUVs pour atteindre un plateau 30 minutes après ajout ; l'addition de la dynamine suivie de l'endophiline permet une liaison plus rapide aux GUVs en l'espace d'une minute (Meinecke et al., 2013). L'absence du domaine PRD de la dynamine ne permet pas la liaison de l'endophiline aux GUVs (Meinecke et al., 2013). Les mêmes observations ont été faites pour l'amphiphysine (Meinecke et al., 2013). En présence de dynamine et d'endophiline (ou d'amphiphysine), l'ajout de GTP conduit à une nette diminution de la taille des GUVs révélant la scission des vésicules (Meinecke et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la dynamine, l'endophiline et l'amphiphysine ont des rôles coopératifs dans la fission de la vésicule à clathrine.

➤ **Lien entre la dynamine, l'endophiline et l'actine**

En absence de dynamine, l'actine et l'endophiline sont colocalisées dans la cellule (Ferguson et al., 2009). L'altération du fonctionnement de l'actine, par traitement à la Latrunculine A bloque l'endocytose, conduisant à des puits à clathrine en forme de « u » (Ferguson et al., 2009). Après surexpression, l'endophiline et la cortactine sont colocalisées dans les cellules n'exprimant plus la dynamine (Ferguson et al., 2009). Toutefois, la surexpression de la cortactine et de l'endophiline ne permet pas l'entrée de la transferrine dans la cellule en absence de la dynamine. De plus, l'absence de dynamine ou de son domaine PRD perturbe la localisation de l'actine dans les cellules (Ferguson et al., 2009).

➤ **Lien entre SNX9, dynamine et actine**

La dynamine interagit *in vitro* et *in vivo* avec SNX9 (Soulet et al., 2005). SNX9 semble donc être recrutée tardivement aux puits à clathrine (Soulet et al., 2005). SNX9 est localisée à la membrane plasmique et dans le cytosol (Soulet et al., 2005).

In vitro, l'activité GTPasique de la dynamine fixée à des liposomes est augmentée en présence de SNX9 qui se lie majoritairement aux liposomes de petite taille (50 à 100 nm) en reconnaissant le PI(4,5)P2 (Soulet et al., 2005). A l'aide de siRNA, l'implication de SNX9 dans la séparation de la vésicule a pu être confirmée par l'observation d'une diminution du taux d'internalisation de la transferrine (Soulet et al., 2005). La déplétion de SNX9 n'affecte pas la quantité de dynamine, ni sa durée de vie, dans la cellule contrairement à l'absence des amphiphysines et /ou des endophilines (Meinecke et al., 2013). SNX9 interagit aussi avec N-WASP, Arp2/3 et la dynamine (Shin et al., 2008).

En conclusion, les protéines courbant les membranes sont nombreuses dans la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. La multiplicité de ces dernières suggère la possibilité d'une redondance dans leurs fonctions d'autant que l'internalisation de la transferrine est affectée par l'absence d'amphiphysines mais pas de SNX9, ni des endophilines alors que ces dernières sont recrutées au cours de ce processus d'entrée médié par la clathrine (Meinecke et al., 2013). De plus, une action conjointe de la dynamine avec l'actine et avec des protéines à domaine BAR est tout à fait envisageable ((A. E. L. Roux & Plastino, 2010), ((Picas et al., 2014), (Antonny et al., 2016))). Les éléments soutenant cette hypothèse viennent, de leur capacité à interagir entre eux et l'endophiline tout comme la dynamine, seraient capable de former une hélice (57 à 67 nm, ((Gu et al., 2010); (Ferguson et al., 2009)), (Frost et al., 2009)). Cependant, le fonctionnement de ces trois protéines dans l'étape de scission reste encore à confirmer (Antonny et al., 2016).

ii. La voie cavéoline

L'un des points communs des voies indépendantes de la clathrine est le rôle important que joue le cholestérol. Parmi ces voies, celles des cavéoles, des ancrs GPI et des récepteurs de cytokines semblent s'initier au niveau des radeaux lipidiques, microdomaines riches en cholestérol (Lingwood & Simons, 2010).

a. Présentation

La voie des cavéoles correspond à un enrichissement de vésicules en cavéoline qui réside dans les radeaux lipidiques. Toutefois, l'existence de ce mécanisme reste controversée. De plus, aucun récepteur physiologique ne l'emprunterait ce qui complique l'étude de ce mécanisme. La toxine du Choléra, ainsi que d'autres toxines bactériennes et des virus, a été colocalisée avec les cavéoles ((van Deurs et al., 2003), (Tagawa et al., 2005)). Ce processus d'internalisation serait plutôt nécessaire à la régulation de la membrane plasmique et impliqué dans un rôle de transcytose. Les vésicules se présentent sous trois formes : vésicules simples, en chaîne ou en cluster/rosette (van Deurs et al., 2003).

1. Deux degrés de mobilité des cavéoles dans les cellules

La surexpression de la cavéoline fusionnée à la GFP a été utilisée pour étudier la dynamique de cette protéine à la membrane plasmique. A l'aide de la technique « Florescence Recovery After Photobleaching » FRAP, l'étude du recouvrement de la fluorescence permet de déterminer le niveau de mobilité de la protéine étudiée, un recouvrement rapide témoignant d'une forte mobilité. Dans la voie des cavéoles, la cavéoline à la membrane plasmique est particulièrement peu mobile puisque seule 10% de la fluorescence réapparaît dans la zone de FRAP (15 à 60 minutes après le FRAP) dans la région photoblanchie. La cavéoline cytosolique est hautement mobile puisque 90% de la fluorescence réapparaît 15 à 60 minutes après le FRAP (van Deurs et al., 2003).

2. Les facteurs conduisant à la mobilité des cavéoles

L'ajout de SV40 augmente le dynamisme des cavéoles à la surface cellulaire d'un facteur 2 alors qu'en l'absence du virus, la majorité des cavéoles sont immobiles (Tagawa et al., 2005). Les résultats ont ensuite été confirmés par la technique du FRAP au niveau des cavéosomes ; en absence de SV40, la fluorescence n'est pas réapparue dans la zone photoblanchie même après une observation prolongée, alors qu'en présence de SV40, la fluorescence est réapparue une à deux minutes après le FRAP (Tagawa et al., 2005).

Pour étudier la dynamique des cavéoles dans la cellule, les auteurs ont produit des cellules « hétérocaryotypique » produisant à la fois la cavéoline-GFP et la cavéoline-RFP provenant de deux cellules différentes (Tagawa et al., 2005). Dans le contrôle, les cavéolines GFP et RFP n'étaient que peu colocalisées trois heures après fusion des cellules (30%) alors que l'ajout de SV40 a induit une réorganisation plus importante (60% de colocalisation) (Tagawa et al., 2005). La présence de SV40 entraîne une activation des cavéoles précédemment formées, grâce à une réorganisation de l'actine corticale permettant aux cavéoles de se détacher et de s'associer aux microtubules. Par comparaison, la même expérience a été réalisée en marquant la clathrine et, au bout de trois heures, les marquage GFP et RFP étaient superposés à 100% (Tagawa et al., 2005). La déplétion du cholestérol suivie d'une réintroduction du cholestérol dans les cellules a conduit à une relocalisation des deux marquages (GFP + RFP) de la cavéoline (Tagawa et al., 2005). Ces résultats montrent que le trafic du cholestérol joue sur le dynamisme des cavéoles.

En résumé, l'existence de la voie des cavéoles reste discutée puisque son rôle *in vivo* n'est pas démontré, même si les études de dynamique semblent montrer la possibilité de multiples fonctions dans la cellule. Elle pourrait servir de régulation de la membrane, en plus de son implication dans la transcytose dans les cellules polarisées. La structure des vésicules est, en revanche, plus détaillée avec un rôle de la cavéoline en tant que manteau supplée par les cavines.

b. Les facteurs impliqués dans la courbure de la membrane

1. La dynamine et ces partenaires

La dynamine colocalise avec les cavéoles observées par marquage en immunofluorescence (Henley et al., 1998). Sur les images en microscopie électronique, la dynamine a été visualisée sur des cavéoles isolées, en rosette, attachées à la membrane plasmique et même détachées dans la cellule (Henley et al., 1998). La dynamine est localisée au niveau du cou de la cavéole *in vivo* sur des images de microscopie électronique (Oh et al., 1998).

La dynamine, le cytosquelette d'actine et des kinases sont requis pour la formation des cavéoles. La phospholipase D1 est enrichie dans la même fraction subcellulaire que la cavéoline (fractionnement cellulaire, (J. H. Kim et al., 1999)). L'interaction directe de ces deux protéines a ensuite été confirmée par GST « pulldown » (J. H. Kim et al., 1999).

2. La protéine « Epsin homology domain 2 » EHD2

La structure d'EHD2 a certaines similitudes avec celle de la dynamine (Daumke et al., 2007). Elles peuvent toutes deux se lier aux membranes, présentent deux conformations et ont une activité enzymatique ATPase et GTPase. EHD2 est majoritairement présente à la membrane plasmique et ne colocalise pas avec les marqueurs EEA1, Rab 9, Rab 11, Rab7 correspondant respectivement aux endosomes précoces, tardifs, de recyclage et de trafficking (Moren et al., 2012). EHD2 colocalise en immunofluorescence avec la Cavine 1 et la Cavine 2 ainsi qu'avec la cavéoline 1 (Stoeber et al., 2012). Les cellules « dépourvues » d'EHD2 par siRNA ont une mobilité plus grande (Stoeber et al., 2012). La toxine B du choléra a été détectée dans les cavéoles ayant EHD2 (Stoeber et al., 2012). Les cavéoles sans EHD2 sont mobiles, suggérant que cette dernière stabilise les cavéoles où qu'elle se détache au moment de la séparation de la vésicule (Stoeber et al., 2012). Le devenir d'EHD2 à la membrane plasmique a été analysé par FRAP ; la fluorescence photoblanchie correspondant à EHD2 réapparaît quasi-intégralement (80% du signal) précisément à la même position qu'avant le photoblanchiment. Ces résultats

sont en faveur d'un cycle d'assemblage-désassemblage – réassemblage (« Kiss-and-run ») sur des cavéoles statiques ce qui n'est pas le cas des cavéoles EHD2 négatives (Stoeber et al., 2012).

Le contact d'EHD2 avec les liposomes se produit via les résidus Phe-322 de la protéine dimerisée formant un pont dont les extrémités interagissent avec les liposomes (Daumke et al., 2007). Le remplacement de ce résidu en Ala est suffisant pour perdre la localisation membranaire *in vitro* et *in vivo* dans des cellules type HeLa (Daumke et al., 2007). Ce résidu appartient au domaine hélicoidal d'EHD2 et influence son activité ATPasique (Daumke et al., 2007). De plus, il semblerait qu'une faible proportion des cavéoles contienne de la Pascine 2 (syndapine), suggérant que ces cavéoles statiques pourraient servir de plateforme provisoire avant internalisation, puisque la pascine 2 a également été impliquée dans la biosynthèse des cavéoles ((Moren et al., 2012), (Hansen et al., 2011)). L'actine colocalise avec la cavéoline 1 et la déplétion par siRNA d'EHD2 affecte cette colocalisation (Stoeber et al., 2012).

En résumé, EHD2 joue un rôle dans le maintien de la structure d'une classe de cavéoles statiques impliquant notamment l'actine, la cavéoline 1 et la cavine 1 (Moren et al., 2012).

C. Les voies d'endocytose produisant des vésicules de petites tailles sans manteau

i. La voie CLIC / GEEC

a. Définition

1. Les marqueurs de ce mécanisme

La voie « clathrin-independent carrier GPI-AP enriched early endosomal compartement » (CLIC / GEEC) sert à internaliser les protéines à ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI) telles que le récepteur du folate. Pour suivre ce mécanisme, la toxine du choléra, CD44 et le dextran sont les marqueurs les plus utilisés. L'ancrage GPI est une modification post-traductionnelle ajoutée aux protéines possédant le CAAX à leur extrémité C-terminale,

catalysée par une enzyme appelée la transaminase. Après addition de l'ancrage GPI, la protéine modifiée, devenue une GPI-AP, est insérée dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Les protéines GPI-AP sont internalisées dans des endosomes différents de ceux qui contiennent notamment la transferrine (Sabharanjak et al., 2002). Elles colocalisent avec le dextran et la toxine cholérique et sont absentes des cavéoles dans un mécanisme indépendant de la clathrine et de la cavéoline ((Sabharanjak et al., 2002), (Kirkham et al., 2005)).

2. L'aspect des vésicules

Les vésicules contenant la toxine du choléra (CTxB) sont de formes tubulaires, le marquage en microscopie électronique ressemblant à une structure en croissant de lune ou en anneau (Kirkham et al., 2005). Ces structures sont proches des cavéoles, toutefois, les vésicules contenant CTxB ont aussi été observées dans des cellules dépourvues de cavéoline (Kirkham et al., 2005). La forme tubulo-vesiculaire a été modélisée à partir d'images prises en microscopie électronique d'un marquage de CD44 (Lakshminarayan et al., 2014).

b. Les protéines courbant les membranes

1. Le regroupement local de la galectine 3

La déplétion des Glycosphingolipides (GSL) diminue drastiquement l'entrée de CD44 alors que l'internalisation de la transferrine n'est pas affectée (Lakshminarayan et al., 2014). La galectine 3, par regroupement local, est impliquée dans la voie CLIC / GEEC et peut interagir avec des protéines CLIC (Lakshminarayan et al., 2014). Ce résultat a été obtenu par analyse protéomique et par colocalisation (Lakshminarayan et al., 2014). En effet, à 2 minutes d'endocytose, 60% de colocalisation de CD44 avec la galectine 3 a été observé (Lakshminarayan et al., 2014). De plus, la déplétion de la galectine 3 diminue le nombre des vésicules portant CD44 par cellule. La N-glycosylation de CD44 permet le regroupement local de la galectine 3 et l'internalisation de CD44 (Lakshminarayan et al., 2014).

2. La controverse sur l'implication de la dynamine

Le mécanisme CLIC / GEEC serait indépendant de la dynamine ((Kumari & Mayor, 2007), (Renard et al., 2015)). L'expression d'un mutant dominant négatif K44A de la dynamine ne semble pas affecter l'internalisation de la galectine 3 contrairement à celle de la transferrine (Lakshminarayan et al., 2014). Toutefois, le dynasore, un inhibiteur de la dynamine, empêche également l'internalisation du dextran (Lundmark et al., 2008). La spécificité du dynasore a été dernièrement remise en cause ; en effet, le dynasore, tout comme le dyngo4A, semble avoir des effets « off-target » aux concentrations communément utilisées dans les études sur la dynamine, comme l'illustre notamment son effet (TDK) sur les protrusions membranaires et la morphologie des cellules déplétées (Park et al., 2013). Une controverse persiste concernant l'implication de la dynamine dans la voie CLIC/GEEC ((Kirkham et al., 2005) ou (Lakshminarayan et al., 2014)). De plus, la toxine du choléra pourrait ne pas être un bon modèle et pouvoir entrer dans la cellule par d'autres mécanismes d'endocytose, notamment en fonction de la concentration extracellulaire utilisée, comme cela a été montré pour le récepteur de l'EGF. Tout dernièrement, une action commune de l'endophiline, de l'actine et de la dynamine a été proposée pour permettre la scission de la vésicule contenant la toxine du choléra (Renard et al., 2015).

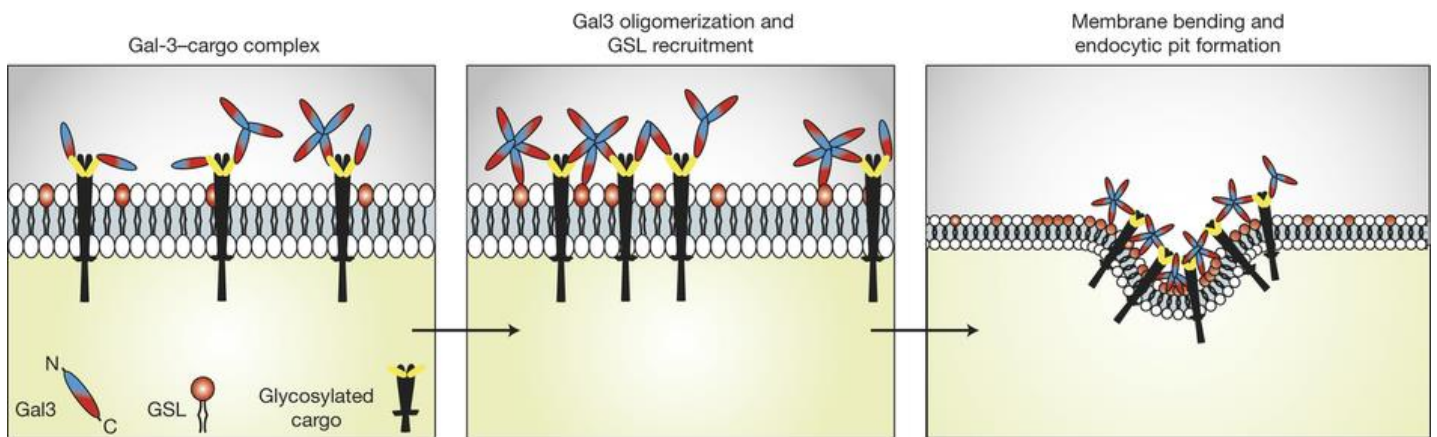


Figure 28 : Les courbures membranaires liées à la formation de "cluster" de galectine 3
 Outre la taille du cargo, son association avec la galectine 3 (qui interagit aussi avec les membranes) permettrait le rapprochement dans l'espace des cargos (clusterisation) conduisant ainsi à la formation de la vésicule. Figure de (Lakshminarayan et al., 2014)

3. L'actine

Cette voie utiliserait l'actine et d'autres facteurs comme Arf1 et ses régulateurs ((Kumari & Mayor, 2007), (Sabharanjak et al., 2002)). Toutefois, RhoA n'est pas nécessaire pour l'entrée des protéines GPI-AP excluant que celles-ci emprunte le même chemin que l'IL-2R.

4. Les protéines à domaine BAR

Les protéines courbant les membranes grâce à leur domaine BAR sont également nécessaires à la formation de la vésicule. En effet, la déplétion de « GTPase Regulation Associated with Focal Adhesion kinase-1 » (GRAF1) appartenant à la famille des BAR-PH, entraîne une diminution de l'entrée du dextran (Lundmark et al., 2008). GRAF1 se lie préférentiellement aux liposomes de petite taille (50 nm) bien qu'elle puisse aussi interagir avec des liposomes allant jusqu'à 800 nm (Lundmark et al., 2008). La capacité de liaison de GRAF1 avec les membranes des liposomes décroît lorsque la courbure générée par le liposome diminue (Lundmark et al., 2008). GRAF1 reconnaît spécifiquement le phosphoinositide PIP2 et peut former des tubules dans la cellule et *in vitro* sur des liposomes (Lundmark et al., 2008). De plus, le domaine SH3 de GRAF1 interagit avec le domaine PRD de la dynamine, comme cela a été démontré par co-immunoprécipitation ; ainsi la dynamine pourrait être requise de concert avec GRAF1 pour séparer la vésicule de la membrane plasmique (Lundmark et al., 2008). Récemment, il a été proposée que la toxine de Shiga emprunterait également cette voie, ces travaux suggérant également l'implication de l'endophiline (une autre protéine à domaine BAR, (Renard et al., 2015)).

En conclusion, les protéines à ancre GPI utilisent une voie indépendante de la clathrine, de la cavéoline et qui est distincte de la voie utilisée par la chaîne β de l'IL-2R (Sabharanjak et al., 2002). De plus, l'actine et la protéine GRAF1, ainsi que le regroupement local de la galectine 3, ont un rôle essentiel dans la formation de la vésicule.

ii. La voie des cytokines suivie par le récepteur de l'interleukine 2

Dans les années 1980, le devenir de ce récepteur dans la cellule a été étudié par microscopie électronique. Les images prises montraient que l'IL-2R était présent dans des structures de type « clathrin coated pits » CCP faisant penser, à tort, que ce cargo emprunterait la voie dépendante de la clathrine (McCrae, Maxwell, & Ceredig, 1988). Une étude plus récente utilisant la microscopie électronique a montré l'absence de manteau recouvrant les vésicules enrichies en IL-2R, suggérant une endocytose indépendante de la clathrine (Duprez, Ferrer, Cornet, Olive, & Dautry-Varsat, 1991). Des études ultérieures ont formellement montré que les récepteurs de cytokines sont des cargos physiologiques empruntant une voie indépendante de la clathrine et de la cavéoline ((Subtil et al., 1994), (Lamaze et al., 2001), (Sauvonnet, Dujancourt, & Dautry-Varsat, 2005)).

a. La physiologie du récepteur de l'interleukine 2

1. Composition du récepteur

Le récepteur de l'interleukine 2 (IL-2R) est composé de trois chaînes, α (50-55 kDa), β (70-75 kDa) et γ (65 kDa), capables de s'oligomériser. La chaîne β est commune aux récepteurs de l'interleukine 2 et 15 alors que la chaîne γ est partagée par ceux de l'interleukine 2, 4, 7, 9, 15 et 21 (Schluns & Lefrançois, 2003).

La chaîne α a une faible affinité pour le ligand IL-2 et ne peut induire à elle seule les cascades de signalisation. Les trois chaînes associées forment le récepteur de l'IL-2 de haute affinité et produisent les cascades de signalisation. Les chaînes β et γ peuvent former une structure d'affinité intermédiaire, également capable de conduire, *in vitro*, à la signalisation de ce complexe. Toutefois, cela ne se produit pas *in vivo* car la concentration en IL-2 requise n'est pas physiologique.

2. Importance du récepteur dans la réponse immunitaire

Le mécanisme d'endocytose de l'IL-2R est régulé, tout déséquilibre pouvant conduire à des maladies graves autoimmunes (Semenzato, Pizzolo, & Zambello, 1992). La « severe combined immunodeficiency » SCID a été une des maladies les plus étudiée conduisant même à des essais de thérapie génique. Elle se caractérise par un défaut de réponse immunitaire lié à une mutation, voire à la production d'une forme tronquée (variable d'un patient à un autre), affectant la chaîne γ du récepteur de l'IL-2 rendant certains types de cellules T et B absentes ou non fonctionnelles (Morelon et al., 1996).

3. La transmission du signal par les récepteurs de cytokines

Les récepteurs de cytokines sont des glycoprotéines. L'interaction ligand-récepteur conduit à une transmission de signal dans la cellule permettant d'activer la réponse immunitaire. Les récepteurs de cytokines sont divisés en deux classes, les types I et II. L'IL-2R appartient au premier groupe qui se caractérise par la nécessité de recruter des tyrosines kinases (JAK) pour effectuer la transduction du signal.

Ces récepteurs sont composés de trois régions, extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire, plus ou moins longues selon les chaînes. Quatre résidus d'acides aminés sont particulièrement conservés, ainsi qu'un motif TRP-SER-X-TRP-SER dans la partie externe dont le rôle n'est pas défini. Dans le cas de l'IL-2R, les chaînes β et γ sont des récepteurs de cytokines de type I. La chaîne α n'est pas un récepteur de cytokine, elle participe exclusivement à l'affinité du récepteur à l'IL-2. La chaîne β comprend 585 résidus d'acides aminés dont 286 correspondant à la partie interne et γ a 347 résidus d'acides aminés dont 86 correspondent à la partie interne. La chaîne α constituée de 251 résidus d'acides aminés dont 13 correspondant à la partie interne.

Les chaînes β et γ possèdent deux sous-domaines permettant le recrutement des protéines JAK1 (sur la chaîne β) et JAK3 (sur la chaîne γ). Elles ont aussi respectivement six et quatre résidus Tyr phosphorylables qui modulent leur association avec les protéines STAT.

4. La cascade de signalisation induite par l'IL-2

L'oligomérisation de $\alpha\beta\gamma$ donne lieu à une activation de JAK1 et JAK3 par un mécanisme appelé la trans-phosphorylation ajoutant un groupement phosphate sur JAK1 et JAK3 par leur mise en contact lors de la dimérisation. Ces tyrosines kinases se phosphorylent donc l'une et l'autre avant d'activer à leur tour la phosphorylation de résidus Tyr des chaînes (β et γ) ce qui conduit au recrutement en positions 338, 392 et 510 de STAT1, STAT3 et STAT5A respectivement. Une fois activées, les STATs se relocalisent dans le noyau modulant l'expression de gènes cibles et activant le signal mitogénique (Gaffen, 2001).

L'activation de la cascade JAK/STAT, PI3K et MAPK s'ensuit conduisant à la prolifération des cellules et à leur survie. En parallèle, des membres de la famille des kinases Src (Lck, Fyn, Lyn) se lient à la chaîne β et activent la phosphorylation des résidus Tyr de la chaîne β en présence de l'IL-2.

Plusieurs travaux suggèrent un lien étroit entre les cascades de signalisation et l'endocytose du récepteur. Notamment, un anticorps « crosslinké » empêche l'internalisation du récepteur ce qui conduit à une nette diminution de la viabilité de ces cellules (Duprez, Ferrer, Cornet, Olive, & Dautry-Varsat, 1991). De plus, l'endocytose induite par l'IL-2 est deux fois plus rapide que l'endocytose sans ligand (constitutive).

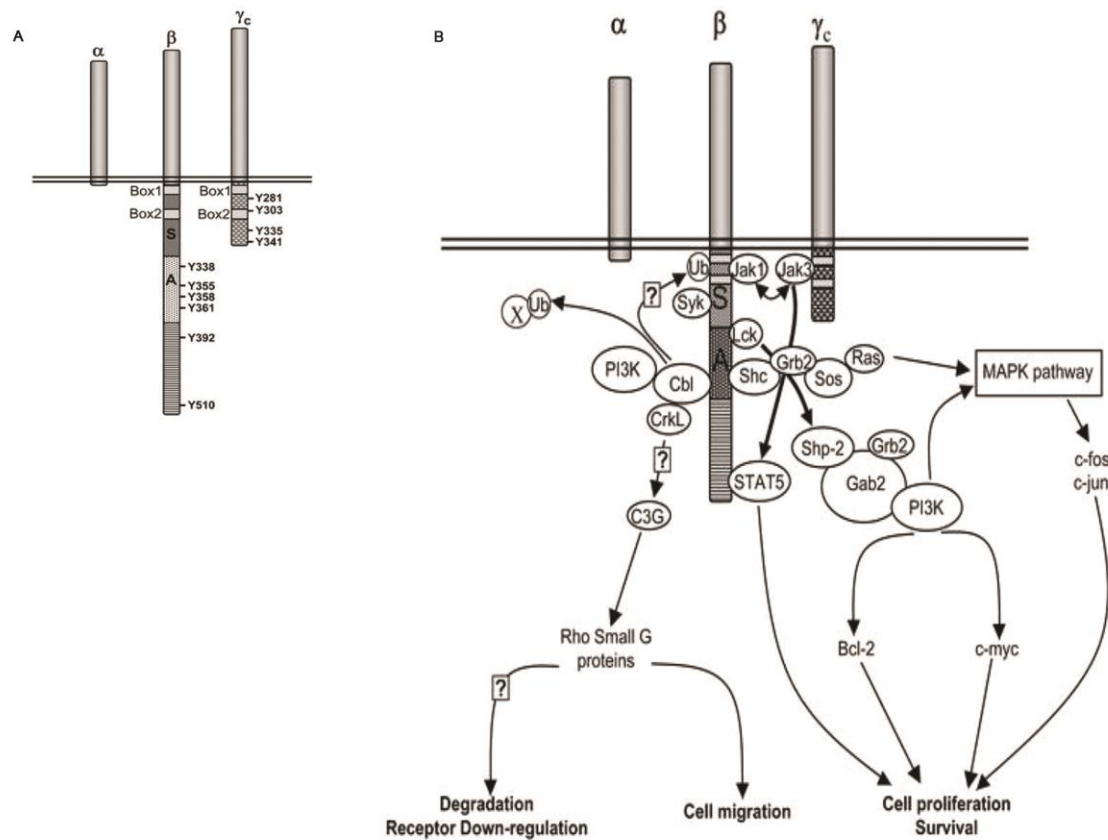


Figure 29 : La cascade de signalisation de l'IL-2R

(A) Le récepteur de l'IL-2 est constitué de trois chaînes : α , β , γ . La partie intracellulaire des chaînes β et γ sont essentielle pour la signalisation.

(B) L'oligomérisation du récepteur en présence du ligand (IL-2) conduit à la transphosphorylation des protéines JAK qui sont à l'origine des différentes cascades de signalisation permettant notamment la prolifération des cellules.

Figure de (Gesbert et al., 2004)

a. L'endocytose des récepteurs de cytokines

1. Les signaux d'endocytose et ceux de tri vers la dégradation

L'endocytose de la chaîne γ dépend de trois régions, 1-35, 35-40 et 40 à 65 (Morelon & Dautry-Varsat, 1998). La région 35 à 40 est nécessaire pour son internalisation et pour sa dégradation. Le signal permettant l'entrée de β est compris dans ses 27 premiers résidus cytosoliques (Subtil et al., 1998). Les 40 premiers résidus cytosoliques sont suffisants pour permettre la dégradation de γ , les résidus de la position 35 à 40 (ESLQP) conduisant au « sorting » vers la dégradation (Morelon & Dautry-Varsat, 1998).

En 2001, le groupe d'Alice Dautry a montré que l'IL-2R est ubiquitinylé (Rocca et al., 2001). Gesbert *et al* ont proposé que CBL, une ubiquitine ligase, joue un rôle de protéine adaptatrice et régule l'ubiquitination des récepteurs qui seraient alors spécifiquement triés vers les lysosomes et dégradés. Le tri du récepteur vers les lysosomes proviendrait de l'ubiquitination de la chaîne γ par une ubiquitine ligase c-CBL (Gesbert, Malardé, & Dautry-Varsat, 2005). Les chaînes β et γ sont toutes deux ubiquitinylées et triées vers les endosomes précoces et les lysosomes pour être dégradées.

Les résidus 20-27 (L-S-K-F-F-S-Q-L) de la chaîne β ont un rôle essentiel. La délétion des résidus 22 à 27 bloque la dégradation de la chaîne β (Subtil et al., 1998). L'ubiquitine modifiant les protéines sur les résidus Lys (K), le groupe d'Alice Dautry, s'est intéressé aux résidus K présents dans la séquence correspondant au signal de « sorting » (résidus 18-27 de la chaîne β) permettant la dégradation du récepteur ((Hershko & Ciechanover, 1998), (Subtil et al., 1998)). Deux résidus lysine sont présents en position 8 et 26 (Rocca et al., 2001). Les remplacements K8E et K26A n'affectent pas l'internalisation mais conduisent à une perte de l'efficacité de dégradation du récepteur (Rocca et al., 2001).

2. L'endocytose constitutive des chaines β et γ

L'endocytose constitutive est étudiée dans les cellules épithéliales humaine (de type Hep2) dans lesquelles les chaines β ou γ (ou les deux) ont été stablement transfectées. La demi-vie de la chaîne β de l'IL-2R est de 110 minutes (Hémar et al., 1994). Cette mesure a été déterminée après un prétraitement des cellules avec la cycloheximide, une drogue bloquant la synthèse de nouvelles protéines (Hémar et al., 1994). Dans ces conditions, l'IL-2R β est présent à la membrane plasmique ainsi que dans la cellule montrant que l'IL-2R β est bien internalisé en absence de ligand et de la chaîne γ (Hémar et al., 1994). Les mêmes observations ont été obtenues pour la chaîne γ qui est également capable d'être internalisée seule et sans ligand dans la cellule (Morelon & Dautry-Varsat, 1998). De même, le temps de demi-vie de γ est similaire (120 minutes) à celui de β (Morelon & Dautry-Varsat, 1998). Dans les conditions de prétraitement à la cycloheximide, le récepteur internalisé n'est pas recyclé à la membrane plasmique après le décapage à la trypsine. En absence de ce traitement, le récepteur est présent à la membrane plasmique après le décapage démontrant ainsi l'équilibre entre la dégradation et la présentation du récepteur à la membrane plasmique ((Duprez, Lenoir, & Dautry-Varsat, 1985)). Comme la dégradation a lieu malgré l'absence de biosynthèse (cydoheximide), il est possible que ces deux mécanismes puissent être indépendants ou qu'un mécanisme de régulation permettrait à cette balance de se maintenir...

Contrairement aux chaines β et γ , la chaîne α est peu, voire pas du tout, endocytée (moins de 10% d'internalisation) dans les cellules K562, une lignée cellulaire humaine erythroleucémique, dans laquelle le gène codant α a été transfecté (Subtil et al., 1997). La partie cytosolique de la chaîne α est peut-être trop courte (13 résidus d'acides aminés) pour contenir un signal d'endocytose. Ces résultats sont confirmés par le marquage par immunofluorescence de la chaîne α qui est uniquement membranaire (Morelon & Dautry-Varsat, 1998).

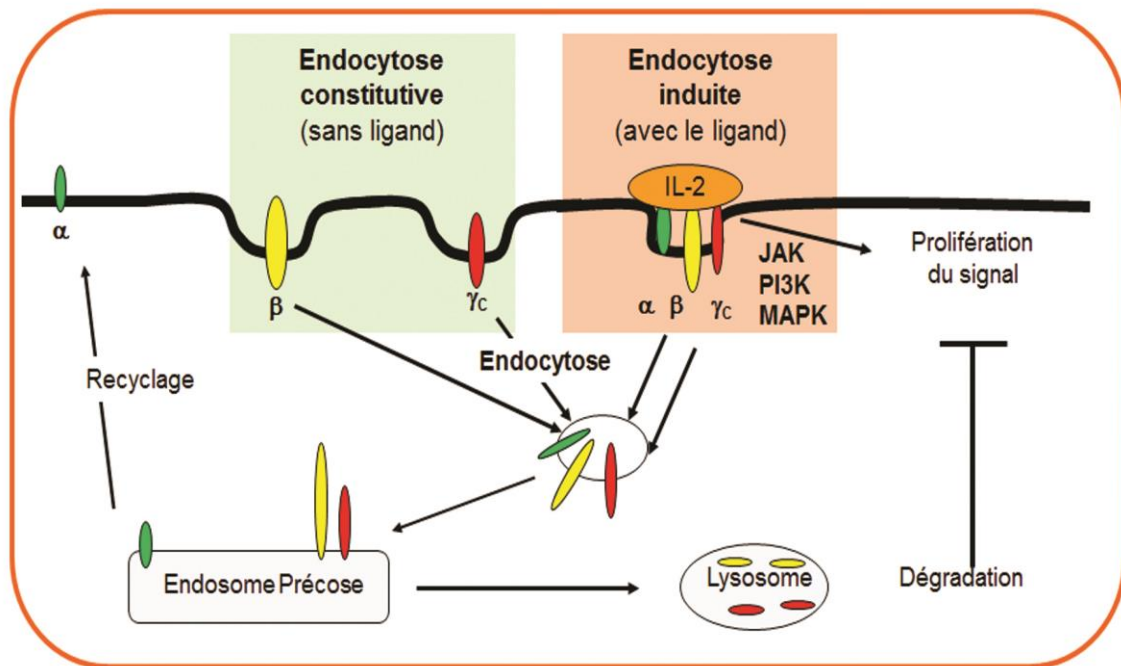


Figure 30 : L'endocytose constitutive et induite suivie par l'IL-2R

En absence de ligand, les chaines β et γ peuvent être endocytées constitutivement et être dégradées mais ne conduisant pas à l'activation des cascades de signalisation.

En présence du ligand (IL-2), les chaines α , β , γ se regroupent et activent les cascades de signalisation. Ce complexe (IL-2, α , β , γ) est internalisé dans les endosomes précoces puis les chaines β et γ sont ciblées vers les lysosomes pour y être dégradées mettant fin à la prolifération du signal.

La demi-vie de la chaîne α est très différente de β et de γ puisque pendant 110-120 minutes seul 5% de la fluorescence liée à α a disparu (Morelon & Dautry-Varsat, 1998).

3. La voie induite par le ligand IL-2

La voie induite par le ligand est étudiée à l'aide de la lignée lymphocytaire humaine Kit225 qui exprime naturellement les trois chaînes du récepteur de l'IL-2R. Les récepteurs de cytokines, activés par leur ligand, peuvent induire de multiples cascades de signalisation conduisant à la réponse immune. En absence du ligand (voie constitutive), le récepteur serait internalisé par le même mécanisme qu'en présence de ce dernier (voie induite). Pour expliquer pourquoi l'internalisation par voie induite est deux fois plus rapide, différentes hypothèses peuvent être évoquées, recrutement plus rapide des protéines impliquées dans l'endocytose ou rôle de l'oligomérisation dans la formation du puits et de la vésicule (Morelon et al., 1996).

4. Le devenir du récepteur après internalisation : les différents compartiments cellulaires contenant l'IL-2R et la cinétique d'internalisation de l'IL-2R

Le récepteur de l'IL-2 est naturellement exprimé par les lymphocytes T/B/NK. Les chaînes γ et β ont été utilisées pour étudier le devenir du récepteur dans la cellule au cours de l'endocytose. La lignée cellulaire IARC 301,5 a été utilisée comme modèle dans les années 1980-1990. A l'aide de la technique de fractionnement cellulaire, les différents types d'endosomes (précoces et tardifs) et les lysosomes ont été isolés ((Duprez, Smoljanovic, Lieb, & DautryVarsat, 1994)). La présence de l'IL-2R marquée radio-activement grâce à son ligand (^{125}I -IL-2), de la transferrine (^{125}I -Tf, marqueur de la voie clathrine) et « Horseradish peroxidase » (HRP) un marqueur de la phase fluide, ont été observés au cours d'un test d'endocytose à 37°C ((Duprez, Smoljanovic, Lieb, & DautryVarsat, 1994)). Les auteurs ont constaté qu'une fraction de la transferrine et de l'IL-2R était présente dans le même compartiment correspondant aux endosomes précoces au bout de 5-10 minutes alors que HRP était présentes dans les trois

structures ((Duprez, Smoljanovic, Lieb, & DautryVarsat, 1994)). Plus récemment, il a été observé que l'IL-2R était présent dans les endosomes tardifs (15 minutes) ainsi que dans les lysosomes (30 à 60 minutes, (Rocca et al., 2001), (Gesbert, Malardé, & Dautry-Varsat, 2005)). La cinétique d'entrée de l'IL-2R est approximativement 2 à 3 fois plus lente que celle de la transferrine (Duprez, Smoljanovic, Lieb, & DautryVarsat, 1994). De plus, l'IL-2R est dégradé dans la cellule contrairement à la transferrine qui est recyclée ((Duprez, Smoljanovic, Lieb, & DautryVarsat, 1994), (Gesbert, Malardé, & Dautry-Varsat, 2005)).

5. Les facteurs identifiés dans la voie d'endocytose de l'IL-2R

L'importance d'une douzaine de facteurs intervenant dans la formation et/ou la scission de la vésicule portant l'IL-2R a été révélée. Je présenterai, dans un premier temps, l'importance de l'actine et sa régulation par le complexe WAVE et la cascade PI3K/Vav2/Rac1/Pak/Cortactine ((Grassart, Meas-Yedid, et al., 2010), ((Basquin et al., 2013), (Basquin et al., 2015); (Grassart et al., 2008)). Puis, je m'intéresserai aux différents acteurs qui singularisent la voie de l'IL-2R par rapport, notamment, aux voies médiées par la clathrine et la macropinocytose.

➤ L'actine et ses régulateurs

La voie des cytokines met en jeu deux activateurs de polymérisation d'actine qui agisse sur le complexe Arp2/3, le complexe WAVE et N-WASP. Le groupe de Nathalie Sauvonnet a étudié le temps de recrutement de protéines liées à l'actine au cours du processus d'endocytose en utilisant la microscopie TIRF. Par l'utilisation de siRNAs dirigés contre les sous-unités du complexe WAVE (Abi1, Sra1, WAVE2 et Brk1), l'équipe a montré que ce complexe est spécifiquement impliqué dans l'endocytose de l'IL-2R et qu'il est recruté avant même l'arrivée de l'IL-2R (Basquin et al., 2015). Grace aux données de microscopie électronique, ils ont remarqué, lors du temps d'endocytose court (2 minutes) que l'IL-2R à la membrane plasmique était souvent proche de protrusions membranaires (79%, (Basquin et al., 2015)).

Ils ont ensuite démontré que le complexe WAVE permet la création de ces protrusions membranaires puisque la déplétion de WAVE réduit fortement l'association entre les protrusions et l'IL-2R β (Basquin et al., 2015). Le complexe WAVE présente un motif peptidique qui reconnaît un motif nommé WIRS défini par la séquence ϕ -X-T/S-F-X-X où ϕ est un résidu hydrophobe et X un résidu quelconque (B. Chen et al., 2014). La séquence YCTFPS contenu dans la séquence peptidique de la chaîne β est un signal WIRS reconnue par le complexe WAVE montrant ainsi que l'interaction entre ces deux protéines pourrait être directe ((Basquin et al., 2015) ; (B. Chen et al., 2014)).

Le recrutement de N-WASP a lieu au moment de l'étape finale de l'endocytose, lorsque la vésicule se détache de la membrane plasmique. L'importance de la PI3K a été étudiée grâce à des drogues inhibant son activité et des cellules lymphocytaires Kit225 (endocytose induite) et épithéliales Hep β (endocytose constitutive) (Basquin et al., 2013). Ces expériences ont montré une forte diminution de l'entrée du récepteur dans les cellules traitées par les drogues ciblant la PI3K (Basquin et al., 2013). Les mêmes expériences ont été réalisées en utilisant la transferrine comme marqueur de la voie dépendante de la clathrine et ont mis en évidence que la PI3K n'était pas requise dans le processus. Ainsi, la PI3K est un acteur spécifique impliqué dans l'endocytose suivie par l'IL-2R (Basquin et al., 2013). La PI3K est constituée d'une sous-unité catalytique (nommé p110) et d'une autre liée à la régulation (p85), les deux sous-unités agissant sur le recrutement de l'actine selon deux mécanismes distincts. La sous-unité p85 interagit grâce à son domaine BH directement avec Rac1 alors que p110 recruterait la «Rho GTP Exchange Factor (GEF) » Vav2, une forme ubiquitaire de la famille des Vav dont la déplétion diminue fortement l'endocytose de l'IL-2R, capable d'activer Rac1 permettant le recrutement de PAK1 qui active à son tour la cortactine. Cette dernière possède deux résidus Ser phosphorylable en positions 405 et 418. Le remplacement de ces deux résidus Ser par des résidus Ala conduit à une perte de la phosphorylation de la cortactine, indiquant que PAK1 est liée à la

phosphorylation de la cortactine, en position 405 ou 418 ou les deux (Grassart, Meas-Yedid, et al., 2010). La surexpression de ce variant dans les cellules Hep2 β bloque l'entrée de l'IL-2R sans affecter celui de la transferrine et conduit au recrutement de N-WASP (Grassart, Meas-Yedid, et al., 2010). Le complexe Arp2/3 est recruté tout au long de l'endocytose de l'IL-2R, illustrant l'importance de l'actine au cours de ce mécanisme (Basquin et al., 2015).

➤ **Quelques singularités de la voie d'endocytose de l'IL-2R**

Des études de microscopie électronique publiées récemment ont montré des vésicules d'un diamètre moyen de 95 nm (de 40 à 180 nm) contenant la chaîne β de l'IL-2R et dépourvues de manteau (Basquin et al., 2015).

– **L'importance des radeaux lipidiques dans la voie de l'IL-2R**

La chaîne γ et β sont associées aux radeaux lipidiques contenant la flotilline 2, une protéine résidante des « rafts » ((Lamaze et al., 2001), (Sauvonnet, Dujeancourt, & Dautry-Varsat, 2005)). Les récepteurs de cytokines utilisent les radeaux lipidiques pour s'internaliser. En effet, la technique de flottaison sur gradient de sucrose a montré la présence de l'IL-2R dans les fractions riches en cholestérol et enrichies en marqueur des rafts GM1 (Lamaze et al., 2001). De plus, l'ajout du ligand IL-2 conduit à une augmentation de la présence du récepteur dans les radeaux lipidiques (Lamaze et al., 2001). Enfin, la séquestration du cholestérol (β -méthylcyclodextrine) inhibe l'endocytose de l'IL-2R (résultats non publiés du groupe de Nathalie Sauvonnet).

– **Le rôle pivot de la dynamine**

La dynamine est également associée à ces radeaux lipidiques (Lamaze et al., 2001). Seulement 20% des chaînes β et γ peuvent encore entrer dans la cellule en absence de l'activité GTPasique de la dynamine ((Lamaze et al., 2001), (Sauvonnet, Dujeancourt, & Dautry-Varsat, 2005)).

L'utilisation d'un mutant de la dynamine dépourvu de cette activité (K44A) conduit à une augmentation de la présence de l'IL-2R dans les radeaux lipidiques (Lamaze et al., 2001). La dynamine est indispensable dans l'étape de la séparation de la vésicule de la membrane plasmique (Sauvonnet, Dujeancourt, & Dautry-Varsat, 2005).

La déplétion de la dynamine a conduit à l'observation en microscopie électronique de puits en forme de U suggérant que cette dernière aurait un rôle dans les étapes de la fin du mécanisme (Basquin et al., 2015). De plus, des études de recrutement des activateurs de polymérisation d'actine montrent que la dynamine est nécessaire au recrutement de N-WASP (Basquin et al., 2015). En absence de dynamine, le recrutement de N-WASP n'a pas lieu et le complexe WAVE ne se dissocie pas du récepteur (Basquin et al., 2015).

– Le lien entre endocytose et cascade de signalisation

La PI3K est particulièrement intéressante puisqu'elle participe aussi, en parallèle, à la cascade de signalisation induite par l'IL-2. Elle permet de contrôler le signal de prolifération cellulaire induit spécifiquement par l'IL-2. De plus, le ligand (IL-2) augmente l'interaction entre la PI3K et l'IL-2R (Basquin et al., 2013). L'endocytose servirait donc à la régulation des cascades de signalisation.

– Comparaison avec la voie médiée par la clathrine

La protéine Eps15, un marqueur de l'endocytose médiée par la clathrine, n'est pas impliquée dans l'internalisation de l'IL-2R, tout comme l'intersectine, la syndapine 2 et Abp1 qui sont des partenaires de la dynamine et de l'actine ((Lamaze et al., 2001), (Sauvonnet, Dujeancourt, & Dautry-Varsat, 2005)). L'IL-2R n'est pratiquement pas localisé (1,2%) avec les puits à clathrine (Lamaze et al., 2001). L'IL-2R est présent presque exclusivement dans les structures qui ne sont pas planes (98%), contrairement à la transferrine majoritairement présente dans des « lattices » à clathrine (60%) ((Lamaze et al., 2001), (Basquin et al., 2015)).

L'utilisation de la jasplakinolide, un inhibiteur de la dépolymérisation d'actine, montre que l'actine est requise pour la voie dépendante de la clathrine et celle de l'IL-2R bien que la régulation de l'actine dans ces deux voies soit différente (Sauvonnet, Dujeancourt, & Dautry-Varsat, 2005), Figure 31).

– Comparaison avec la macropinocytose

Les observations que la macropinocytose et l'endocytose de l'IL-2R partagent plusieurs facteurs tels que Rac1, PAK1, la PI3K, l'actine, N-WASP et le cholestérol ont conduit à penser que l'IL-2R était internalisé par macropinocytose. Or, cela n'est pas le cas. Les différences entre ces deux voies d'endocytose sont : la taille des vésicules produites, l'implication de la dynamine uniquement dans la voie d'entrée des récepteurs de cytokines et l'absence de colocalisation du dextran (marqueur de la macropinocytose) avec l'IL-2R (Basquin & Sauvonnet, 2013).

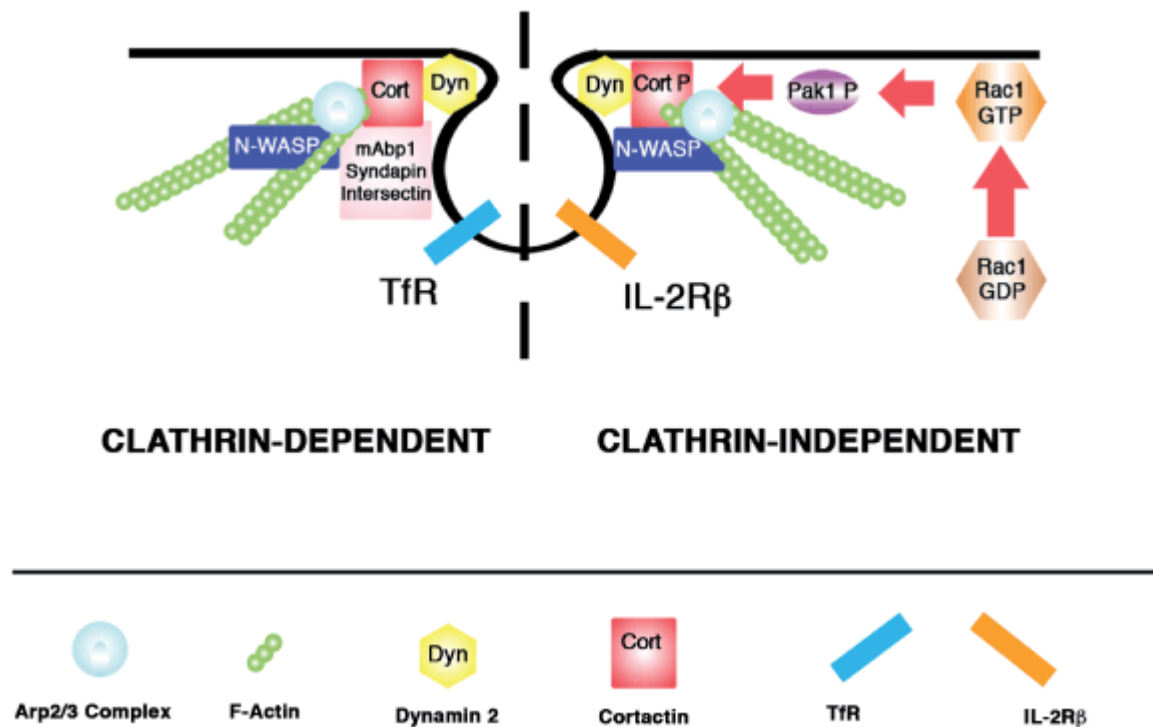


Figure 31 : Régulation de l'actine dans la voie dépendante de la clathrine et celle suivie par l'IL-2R

Dans la voie dépendante de la clathrine, le recrutement de l'actine (complexe avec N-WASP et Arp2/3) se fait par la cortactine, la dynamine, mAbp1, la syndapine et l'intersectine. En revanche, dans la voie indépendante de la clathrine et de la cavéoline, la cortactine est phosphorylée et permet un recrutement plus efficace de l'actine et Abp1, la syndapine et l'intersectine ne sont pas impliquées. Aussi, bien que les protéines nécessaires au recrutement de l'actine sont les mêmes, leur régulation/efficacité sont différentes.

Figure de (Sauvonnet, Dujancourt, & Dautry-Varsat, 2005)

iii. Objectif de la thèse

Lorsque j'ai débuté ma thèse, le mécanisme permettant la formation des vésicules contenant l'IL-2R, en particulier l'initialisation du puits, n'était pas connu. Pour identifier de nouveaux facteurs impliqués dans l'internalisation de l'IL-2R, un crible utilisant des petit ARN interférant (siRNA) réalisé par Cyril Basquin avait permis d'obtenir une liste de 64 protéines pouvant être impliquées dans ce processus. Le but principal de ce crible était d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans l'endocytose de l'IL-2R et, notamment, ceux responsables de l'étape de l'invagination de la membrane. Sur les 64 protéines identifiées (Tableau 1), certaines ont de fortes chances d'induire la courbure de la membrane. Le crible ciblait individuellement 324 protéines ayant de fort potentiel à courber les membranes (Tableau 1). Toutes les protéines à domaine BAR/ANTH/ENTH et une partie de celles à domaine ALPS avaient été testées ainsi que des protéines modifiant les lipides de la membrane plasmique ou interagissant avec le cytosquelette d'actine ou le trafic intracellulaire. Lors de ce crible, les niveaux de déplétion des protéines d'intérêts et le niveau d'expression des récepteurs de la transferrine et de l'IL-2 à la surface cellulaire n'avaient pas été vérifiés. De plus, ces études avaient été réalisées à partir d'un assortiment de quatre siRNAs par cible, augmentant le risque d'effets non spécifiques.

Les protéines sentant ou induisant les courbures membranaires	
Syndapin1	ARHGAP45
PICALM	EndoA1
TOCA1	EndoB2
APPL2	SNX8
SNX6, 18	ABBA-1

Les protéines impliquées dans le trafic intracellulaire			
Arf 3	Arl 4D	ARNO3	RASAL2
Arf 6	Arl 5C	ASAP3	FBXO8
Rab3B, 33A	Arl 6, 9	CENTG2/AGAP-1	PSD2
Taxilin Alpha	HUWE 1	CTGLF2/AGAP-5	Arrestin-β1
Rho E	Arl 10B	ARFGAP1	NECAP1
Rho F	GEFT	ARHGAP4	c-CBL

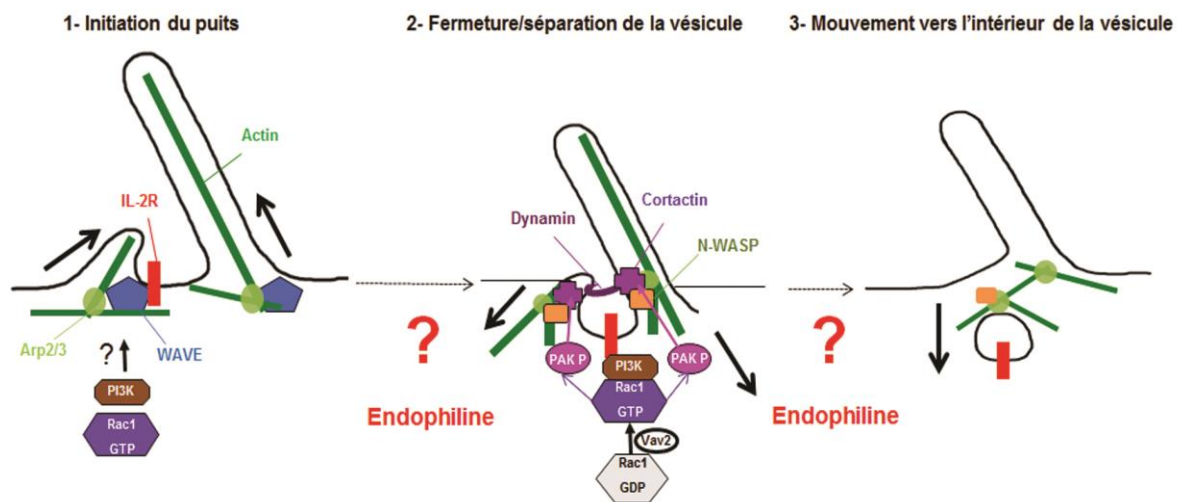
Les protéines interagissant avec la membrane plasmique	
PLD1	Copine 1
PLCB3	Copine 2
PLCD1	Copine 3
PLCG1	Copine 8

Les protéines régulant le cytosquelette		
WIP	Wave 1	SNX11
Fimbrin	Wave 3	SNX16
Myosin 9B	Abi1	SNX19
WASH1	Brk1	SNX20
WIPF3	Sra2	SNX26, 29
ENAH/MENA	Sra1	DIA1

Tableau 1: Les 64 candidats identifiés par le crible siRNA réalisé par Cyril Basquin

Au cours de ma thèse, j'ai donc, dans un premier temps, validé l'implication de certaines des protéines issues du crible : CBL, les endophilines, PLD1 et l'arrestine $\beta 1$. Cette validation a été faite avec les contrôles adéquats en utilisant individuellement quatre siRNAs et en vérifiant pour chaque siRNA le niveau d'expression du récepteur à la membrane plasmique par FACS et le niveau de déplétion de la protéine ciblée par western blot. Puis, j'ai étudié spécifiquement le rôle des endophilines en adressant deux grandes questions :

- Quel est le rôle de l'endophiline dans l'endocytose indépendante de la clathrine suivie par l'IL-2R ?
- Quel est le lien entre l'endophiline et la fonction de la dynamine ? A quelle étape l'endophiline agit-elle ? Lors de la scission des vésicules contenant l'IL-2R ? Fonctionne-t-elle en synergie avec la dynamine ?



Rôles potentiels de l'endophiline dans l'endocytose de l'IL-2 R :

- Rôle dans la création de l'invagination
- Rôle dans la stabilisation du puits initiant la vésicule
- Rôle dans l'étape de la scission

Figure 32 : Rôles potentiels de l'endophiline dans la voie d'endocytose de l'IL-2R

L'endophiline pourrait être nécessaire pour induire l'invagination et/ou stabiliser le puits et/ou pour la séparation de la vésicule de la membrane plasmique.

Figure modifiée de (Basquin et al., 2015)

Résultats

I. Vérification de l'implication des protéines candidates issue du crible dans l'endocytose suivie par L'IL-2R

A. Matériel et Méthodes

i. Cellules, anticorps, plasmides, siRNAs et réactifs

Les cellules Hep2 β sont des cellules épithéliales humaines en lignée (Hep2) exprimant de manière stable la chaîne β du récepteur de l'IL-2 (IL-2R β) (Grassart et al. 2010). Ces cellules ont été cultivées dans des flasques de 75 cm² à 37°C en atmosphère 5% CO₂, dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) avec glutamax I, 4500 mg/L D-Glucose, sans pyruvate de sodium (Gibco), contenant 10% de sérum de veau foetal (Gibco) (SVF) et 1,5 mg/ml de généticine G418 (Gibco), permettant de maintenir l'expression de IL-2R β .

Pour l'immunofluorescence, l'anticorps 561, dirigé contre la partie extracellulaire de l'IL- 2R β , est un monoclonal IgG2a de souris qui a été couplé au laboratoire au fluorochrome « Fluorolink Cy3 monofunctional dye » (561-Cy3, Amersham) et utilisé au 1/1000^{ème}. La transferrine couplée à l'Alexa-fluor 488 (Tf-A488, Invitrogen) a été utilisé au 1/500^{ème}.

Pour le FACS, l'anticorps 561 couplé au laboratoire avec un Alexa-fluor 647 (561-A647, Molecular Probes) : 561-A647, a été utilisé au 1/1000^{ème}.

Nom	Fournisseur	Espèce productrice	Dilution	Taille (protéine)
Endophilin A1 (2G6)	Sigma-Aldrich	Lapin	1/500	40kDa
Endophilin A2 (H-60): sc-25495	Santa Cruz	Lapin	1/500	40kDa
c-CBL	Transduction Laboratories(T.L)	Souris	1/500	120 kDa
PLD1	Sigma-Aldrich	Souris	1/500	124 kDa
La β-arrestine 1	Sigma-Aldrich	Lapin	1/500	47 kDa
La flotilline 2	T.L.	Souris	1/2000	45 kDa
Dynamine 2	Sigma-Aldrich	Souris	1/500	96 kDa
IL-2Rβ (C-20)	Santa Cruz	Lapin	1/1000	75 kDa
GFP	Santa Cruz	Lapin	1/500	27 kDa
Anti Souris HRP	GE Healthcare	Mouton	1/3000	
Anti Lapin HRP	GE Healthcare	Ane	1/5000	
Anti Souris AP	Pierce	Chèvre	1/5000	

Tableau 2 : Les anticorps utilisés pour les westerns blots

Nom	Séquence (5' à 3')
SiC	Non communiqué par le fournisseur (ne ciblant aucun gène)
siC-CBL	Séquence 1 : AAUCAACUCUGAACGGAAA Séquence 2 : GACAAUCCCUCACAAUAAA Séquence 3 : UAGCCCACCUUAUAUCUUA Séquence 4 : GGAGACACAUUUCGGAUUA
siPLD1	Séquence 1 : CAACAGAGUUUCUUGAUUA Séquence 2 : GGUAAUCAGUGGAUAAAUA Séquence 3 : CCAUGGAGGUUUGGACUUA Séquence 4 : CCGGGUAUAUGUCGUGAUA
siArrb1	Séquence 1 : UGGAUAAGGAGAUCUAUUA Séquence 2 : AUGGAAAGCUCACCGUCUA Séquence 3 : GAACUGCCCUUCACCCUAA Séquence 4 : GAACGAGACGCCAGUAGAU
siEndoA1	Séquence 1 : CAACCUAACACGAAUGA Séquence 2 : ACAAAGAUCUUAGGGAAAU Séquence 3 : GAUAUCAUCACUCACUA Séquence 4 : UAAAGAAGUUGGAGGGUCG
siEndoA2	Séquence 1 : GCAAGGCGCUGUACGACUU

	Séquence 2 : CAACUUUGGUGACGCAUUG Séquence 3 : GCCCUAAGCGGGAGUAUAA Séquence 4 : GCAGAAACCAGCCAUGCACA
siEndoB2	Séquence 1 : GCAAAGCUCGGGUGCUCUA Séquence 2 : GACUAGACCUCGUAUUAC Séquence 3 : GCUCUGGAAUGAUGAAGUG Séquence 4 : CCACGACGGUGCCUGACUU
siDyn2	Séquence : GCAGCUCAUCUUCUCAAATT

Tableau 3: Les siRNA utilisés pour cette étude (provenant tous de Dharmacon)

ii. Transfection de siRNAs dans les cellules Hep2 β

Pour chaque protéine à dépléter, 4 siRNAs ciblant 4 séquences différentes par cible ont été transfectés individuellement. Pour chaque transfection, les siRNAs (1 μ l à 5 μ M, 10 nM final) ont été pré-incubés pendant 5 minutes dans de l'Optimem (49 μ l, Gibco) en parallèle 1 μ l de lipofectamine (RNAiMAX, Invitrogen) a été pré-incubé pendant 5 minutes dans de l'Optimem (49 μ l). Puis, ces deux solutions ont été ensuite incubées ensemble pendant 20 minutes à température ambiante. Cette solution mix de 100 μ l a été ajoutée au 400 μ l de cellules (0,5.10⁵cellules/ml) puis déposés dans des puits de plaque 24 puits (12 mm de diamètre). Trois jours après transfection, des analyses d'endocytose, de cytométrie en flux et de western blot ont été réalisées. Ces expériences de transfection des siRNAs et les analyses de leurs effets ont été réalisées au moins trois fois par candidat.

iii. Endocytose par immunofluorescence

Les cellules Hep2 β , sur lamelles dans une plaque 24 puits, comportant environ 10⁵ cellules/puits, ont été pré-incubées pendant quelques minutes à 37°C dans du milieu dit d'internalisation (MI), DMEM ayant 0,5% d'albumine de sérum de bœuf (BSA) (Sigma) et 10 mM de Hepes pH 7,4. L'endocytose de la transferrine et d'IL-2R β ont été suivis en incubant les cellules à 37°C pendant 7 minutes et 15 minutes avec 250 μ l/lamelles de MI ayant de la Tf-A488 et du 561-Cy3, des anticorps reconnaissant la transferrine et l'IL-2R respectivement. Les cellules ont été lavées avec du MI à 4°C puis fixées avec 250 μ l/puits de 4% paraformaldéhyde (PFA) pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Les cellules ont été ensuite lavées et perméabilisées trois fois avec du PBS, 0,1% BSA, 0,05% saponine (tampon de perméabilisation). Le cytoplasme des cellules a été marqué par incubation des lamelles avec du « High Content Screening » (HCS) (1,25 ng/ml, Molecular Probes) pendant 1h. Après trois lavages avec le tampon de perméabilisation, les lamelles ont été montées sur lames avec 9 μ l de Mowiol (Milieu de montage, Calbiochem) contenant du Hoechst 33342 (0,5 ng/ml, Molecular Probes) pour marquer le noyau.

iv. Expression des récepteurs à la surface par cytométrie en flux

Les cellules ont été lavées dans du milieu d'internalisation (MI, à 4°C), puis pour marquer les récepteurs à la surface, les cellules ont été incubées avec l'anti-IL-2R (561-A647) et la transferrine (Tf-A488) dilués dans du MI pendant 40 minutes à 4°C. Après trois lavages avec du PBS 1X à 4°C, les cellules ont été décollées avec du PBS/EDTA (0,5 mM), centrifugées et finalement re-suspendues dans du PBS 1X. Pour éviter l'endocytose, toutes les étapes ont été réalisées sur glace. La fluorescence associée aux cellules a été analysée par un cytomètre en flux FACS Calibur (Becton Dickinson) piloté avec le logiciel CellQuestPro (Becton Dickinson). Ce cytomètre est équipé de deux lasers de longueurs d'ondes à 488 nm et 635 nm permettant

de détecter simultanément et respectivement la transferrine : Tf-A488 (FL1) et l'IL-2R : 561-A647 (FL4).

v. Expression des protéines par western blot

Les cellules ont été lysées avec une solution Tampon Bleu 1X (1% β -Mercapto-éthanol, 10% SDS, 50% Glycérol, 0,05% de colorant bleu) préalablement bouillie. Les échantillons ont été bouillis 5 minutes avant d'être chargés sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE (8%, 10% ou 12% en fonction des protéines) coulés entre deux plaques en verre adaptées au dispositif Biorad. Les échantillons ont été migrés (100 V) puis le gel a été transféré en transfert liquide (à 4°C, sur la nuit à 30 V ou 1h30 à 100V, Biorad) sur membrane PVDF (Amersham) ou nitrocellulose (Amersham) en transfert semi-sec (1h à 18 Volts). La membrane a été saturée dans du lait 5% PBS, 0,1% TWEEN20 pendant 1h à température ambiante. L'anticorps primaire a été incubé en présence de PBS, 0,1% TWEEN 20 (PBST) pendant 1h30, lavée 4 fois 10 minutes avec du PBST, l'anticorps secondaire (couplé à l'Alcaline Phosphatase (AP) ou à l'« Horse Radish Peroxidase » (HRP)) a été incubé en présence de PBST pendant 1h à température ambiante, lavée 4 fois 10 minutes avec du PBST. La membrane a ensuite été révélée soit par ECL (western blotting kit reagents, GE Healthcare, anticorps secondaire HRP) et développée sur film, soit par ECF (Electro-Chimio-Fluorescence kit Amersham, anticorps secondaire AP) et la fluorescence détectée par un FluoroImager 'Typhoon' puis quantifiée avec le logiciel Multigauge.

vi. Imagerie

1. Microscopie à épifluorescence

Le microscope optique Axio observeur.Z1 a été utilisé, il est équipé d'un objectif 20X et des filtres adéquats pour observer la fluorescence produite par le Hoechst et le HCS dans le bleu, la transferrine (Tf-A488) dans le vert et l'IL-2R (561-Cy3) dans le rouge. L'acquisition des images a été réalisée avec une caméra CCD Photometrics. Pour chaque canal (bleu/vert/ rouge)

le temps d'exposition étaient toujours le même afin de pouvoir comparer l'intensité de fluorescence entre chaque condition.

2. Microscopie à onde évanescente (TIRF)

Les acquisitions ont été réalisées avec un microscope à onde évanescente (TIRF, Ix81F-3, Olympus) équipé d'un objectif 100 x NA 1,45 Plan Apo TIRFM (Olympus) et piloté par ordinateur à l'aide du logiciel Cell M (Olympus). Deux lasers solides (488 et 561 nm, Olympus) sont couplés par un condenseur à travers deux fibres optiques. Les deux couleurs ont été acquises simultanément grâce au « Dual View beam splitter » (Optical insights) et aux miroirs séparateur appropriés. Les images ont été prises par IxonEM+Camera (DU885, Andor).

3. Quantification des images par le logiciel : ICY

Les images prises en épifluorescence ont été analysées avec le logiciel ICY (ancien nom QUIA, (Grassart, Meas-Yedid, et al., 2010)). Ce dernier permet de détecter automatiquement le contour des cellules, le nombre d'endosomes et leurs intensités. Par ailleurs, les images prises en TIRF ont également été analysées en utilisant ICY. Les images étaient d'abord corrigées de leur désalignement et les objets dans chaque canal rouge (IL-2R ou Tf) et vert (endophiline A1, dynamine, GFP, spo20 WT) détectés. Deux objets étaient colocalisés lorsque le barycentre des objets était distant de moins de 5 pixels. La taille moyenne des objets étant d'environ 10 pixels. La pertinence des résultats étaient éprouvée statistiquement et les résultats exprimés en pourcentage ((Basquin et al., 2013), (Basquin et al., 2015)).

B. Résultats

Au cours de ma thèse, j'ai vérifié certaines des protéines identifiées par le crible de Cyril Basquin. La confirmation de leur importance a été étudiée par quatre siRNAs indépendants, le niveau de déplétion par le siRNA et l'effet de ce traitement sur le niveau d'expression du récepteur à la surface ont été observés.

Dans ce manuscrit, je ne présenterai que 5 d'entre-elles : l'endophiline A1 et B2, PLD1, c-CBL et la β -arrestine 1. Les deux premières sont particulièrement intéressantes puisque deux des 5 membres de la famille des endophilines étaient représentés dans le crible et qu'elles possèdent un domaine BAR connu pour détecter ou induire l'invagination membranaire. PLD1 est également capable de déformer les membranes en modifiant la composition lipidique de ces dernières, rendant l'étude de cette protéine importante. La première protéine étudiée est CBL, une ubiquitine ligase également impliquée dans la cascade de signalisation de l'IL-2R ainsi que de l'arrestine β -1 qui est nécessaire à l'endocytose de certains récepteurs couplés aux protéines G.

Dans cette section, je présenterai les résultats de deux des quatre siRNAs testés qui affectaient le moins possible la présence du récepteur de l'IL-2 et/ou de la transferrine à la membrane plasmique ou qui conduisaient à des phénotypes cellulaires normaux.

i. L'ubiquitine ligase CBL

Deux siRNAs spécifiques de c-CBL (siCBL_1, siCBL _2 et un siRNA contrôle (siC) ont été utilisés, et introduits par transfection dans les cellules Hep2 β (Matériel et Méthode). Après 72h de transfection, les protéines cellulaires ont été extraites et déposées sur gel SDS-PAGE, puis analysées en western blot avec des anticorps dirigés contre c-CBL et contre la flotilline 2 (Fig. 33C). Nous observons une déplétion spécifique de c-CBL dans les cellules transfectées avec siCBL_1, siCBL_2 (Fig. 33C). De plus, la qualité de l'anticorps a permis de quantifier plus

précisément la déplétion de la protéine. On observe ainsi de l'ordre de 80 à 95% de déplétion de la protéine c-CBL avec chacun des siRNAs.

L'expression à la surface cellulaire de l'IL-2R et de TfR a été analysée en utilisant la cytométrie de flux (Fig. 33D). Pour cela, les cellules Hep2 β , déplétées ou non de CBL, ont été incubées à 4°C avec un anticorps contre la partie extracellulaire de la chaîne β (561) couplé à l'Alexa 647 (561-A647) et avec de la transferrine couplée à l'Alexa 488 (Tf-A488). La fluorescence des cellules suivie en cytométrie a permis d'observer que la quantité à la surface cellulaire d'IL-2R β et de la transferrine n'était pas modifiée par la transfection des siRNAs (effet inférieur à 20 %, Fig. 33D).

Parallèlement, l'endocytose de l'IL-2R et de la transferrine ont été étudiées en incubant les cellules, déplétées ou non pour c-CBL, avec l'anticorps 561-Cy3 et la Tf-A488, pendant 7 et 15 minutes à 37°C. Après fixation des cellules, le cytoplasme et le noyau des cellules ont été marqués au HCS et Hoechst. Un exemple d'image d'immunofluorescence est montré pour les cellules traitées avec siC et siCBL_1. La figure 33A montre une diminution de l'internalisation de l'IL-2R dans les cellules Hep2 β déplétées de c-CBL pour les cellules traitées avec siCBL_1.

En revanche, l'entrée de la Tf ne semble pas affectée. La quantification de l'endocytose d'IL-2R montre qu'il y a entre 50% et 70% d'inhibition dans les cellules traitées avec siCBL_1, siCBL_2 comparée aux cellules traitées avec siC (Fig. 33B). En revanche, le siCBL_1, n'a pas d'effet sur l'entrée de la transferrine (Fig. 33B) alors qu'une augmentation de 40% est observée pour siCBL_2.

En conclusion, les deux siRNAs déplétant spécifiquement c-CBL inhibent fortement l'endocytose de l'IL-2R. Ces résultats montrent que c-CBL est impliquée dans l'endocytose indépendante de la clathrine empruntée par les récepteurs de cytokines.

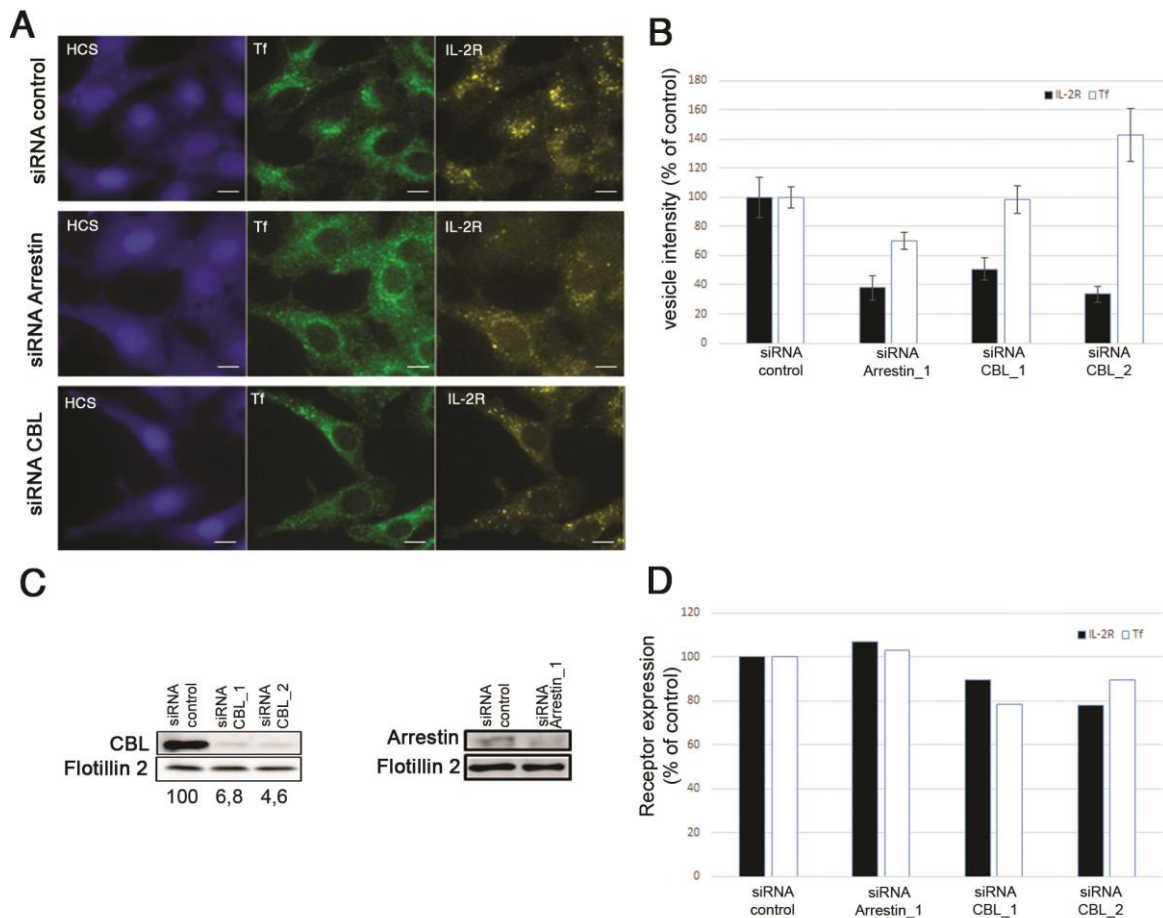


Figure 33 : c-CBL et la β -arrestine 1 sont impliquées dans l'endocytose de l'IL-2R

Les cellules Hep2 β ont été transfectées avec soit un siRNA contrôle (siC), soit 2 siRNAs ciblant c-CBL (siCBL_1, siCBL_2), soit un siRNA dirigé contre la β -arrestine 1 (siArrestin_1) et analysées trois jours après transfection. (A) Les protéines cellulaires ont été extraites, déposées sur gel SDS-PAGE 8% (c-CBL) et 10% (β -arrestine 1) et révélées par western blot avec un anticorps anti-c-CBL ou β -arrestine 1 et Flotilline 2 (témoin de charge). (B) Les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-IL-2R (561-A647) et la transferrine (Tf-A488) pendant 40 minutes à 4°C (marquage de surface) et la fluorescence a été analysée par cytométrie en flux. La moyenne de la fluorescence par cellule est exprimée par rapport au contrôle. (C) Les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-IL-2R (561-Cy3) et la transferrine (Tf-A488) pendant 15 minutes à 37°C pour suivre l'endocytose. Après fixation, le cytosol et le noyau ont été marqués par du HCS. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence avec un objectif 20X. La barre d'échelle représente 10 μ m. (D) La quantification de l'endocytose de l'IL-2R et de la transferrine a été réalisée avec les images d'immunofluorescence décrites en (C) en utilisant le logiciel ICY pour obtenir l'intensité de fluorescence des endosomes. La moyenne de l'intensité des endosomes a été calculée sur au moins 150 cellules et exprimée par rapport au contrôle.

ii. La bêta arrestine 1

L'introduction des siArrb1_2, siArrb1_3 et siArrb1_4 dans les cellules conduisait à une forte mortalité (cellules en autophagie), l'endocytose dans ces cellules n'a donc pas été analysée. Aussi, un siRNA spécifique de la β -arrestine 1 (siArrb1_1) et un siRNA contrôle (siC) ont été utilisés, et introduits par transfection dans les cellules Hep2 β (Matériel et Méthode). Après 72h de transfection, les protéines cellulaires ont été extraites et déposées sur gel SDS-PAGE, puis analysées en western blot avec des anticorps dirigés contre la β -arrestine 1 et contre la flotilline 2 (Fig. 33C). Nous observons une déplétion spécifique de la β -arrestine 1 dans les cellules transfectées avec siArrb1_1 (Fig. 33C). L'expression à la surface cellulaire de l'IL-2R et TfR a été analysée comme décrit précédemment (Fig. 33D). La fluorescence des cellules suivie en cytométrie a permis d'observer que la quantité d'IL-2R β et du TfR, à la surface cellulaire, n'était pas modifiée pour siArrb1_1.

Parallèlement, l'endocytose l'IL-2R et de la transferrine ont été étudiées en incubant les cellules Hep2 β , déplétées ou non pour la β -arrestine 1, avec l'anticorps 561-Cy3 et la Tf-A488 pendant 7 et 15 minutes à 37°C. Après fixation des cellules, le cytoplasme et le noyau des cellules ont été marqués au HCS et Hoechst. Un exemple d'image d'immunofluorescence est montré pour les cellules traitées avec le siC et le siArrb1_1. La figure 33A montre une diminution de l'internalisation de l'IL-2R dans les cellules Hep2 β déplétées de la β -arrestine 1. L'introduction de siArrb1_1 mène à une inhibition de l'endocytose de 60% pour l'IL-2R et de 30% pour la transferrine (Fig. 33A, 33B).

Ainsi, siArrb1_1 déplétant spécifiquement la β -arrestine 1 inhibe fortement l'endocytose de l'IL-2R en affectant plus faiblement celle de la transferrine. Ces résultats montrent que la β -arrestine 1 est impliquée dans l'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine.

Néanmoins, ces conclusions se basant que sur la déplétion de la protéine par un seul siRNA sont à confirmer.

iii. La phospholipase D1 et l'activité catalytique des phospholipases D

Il existe deux isoformes de la phospholipase D (PLD1 et PLD2), seule PLD1 a été révélée par le crible siRNAs. Deux siRNAs spécifiques de la phospholipase D1 (siPLD1_1, siPLD1_2) et un siRNA contrôle (siC) ont été utilisés, et introduits par transfection dans les cellules Hep2 β (Matériel et Méthodes).

Après 72h de transfection, les protéines cellulaires ont été extraites et déposées sur gel SDSPAGE, puis analysées en western blot avec des anticorps dirigés contre PLD1 et contre la flotilline 2 (Figure 34C). Nous observons bien une déplétion spécifique de PLD1 dans les cellules transfectées avec les siPLD1_1, siPLD1_2 (Figure 34C).

L'expression à la surface cellulaire de l'IL-2R et de TfR a été analysée (Figure 34D) comme décrit précédemment (Figure 33). La fluorescence des cellules suivie en cytométrie a permis d'observer que la quantité à la surface d'IL-2R β et de TfR n'était pas modifiée par la transfection des siRNAs (effet inférieur à 20 %, Figure 34D).

Parallèlement, l'endocytose de l'IL-2R et de la transferrine ont été analysées en incubant les cellules déplétées ou non pour PLD1 avec l'anticorps 561-Cy3 et la Tf-A488, pendant 7 et 15 minutes à 37°C comme précédemment décrit figure 33. L'entrée de la Tf ne semble pas affectée. La quantification de l'endocytose de l'IL-2R montre entre 40% et 70% d'inhibition dans les cellules traitées avec les deux siRNAs comparée aux cellules traitées avec le siC (Figure 34B). En revanche siPLD1_1 n'a pas effet significatif sur l'entrée dépendante de la clathrine suivie par la transferrine. Toutefois, la transfection du siPLD1_2 conduit à un effet d'inhibition de 40% de l'endocytose de la transferrine (Figure 34B).

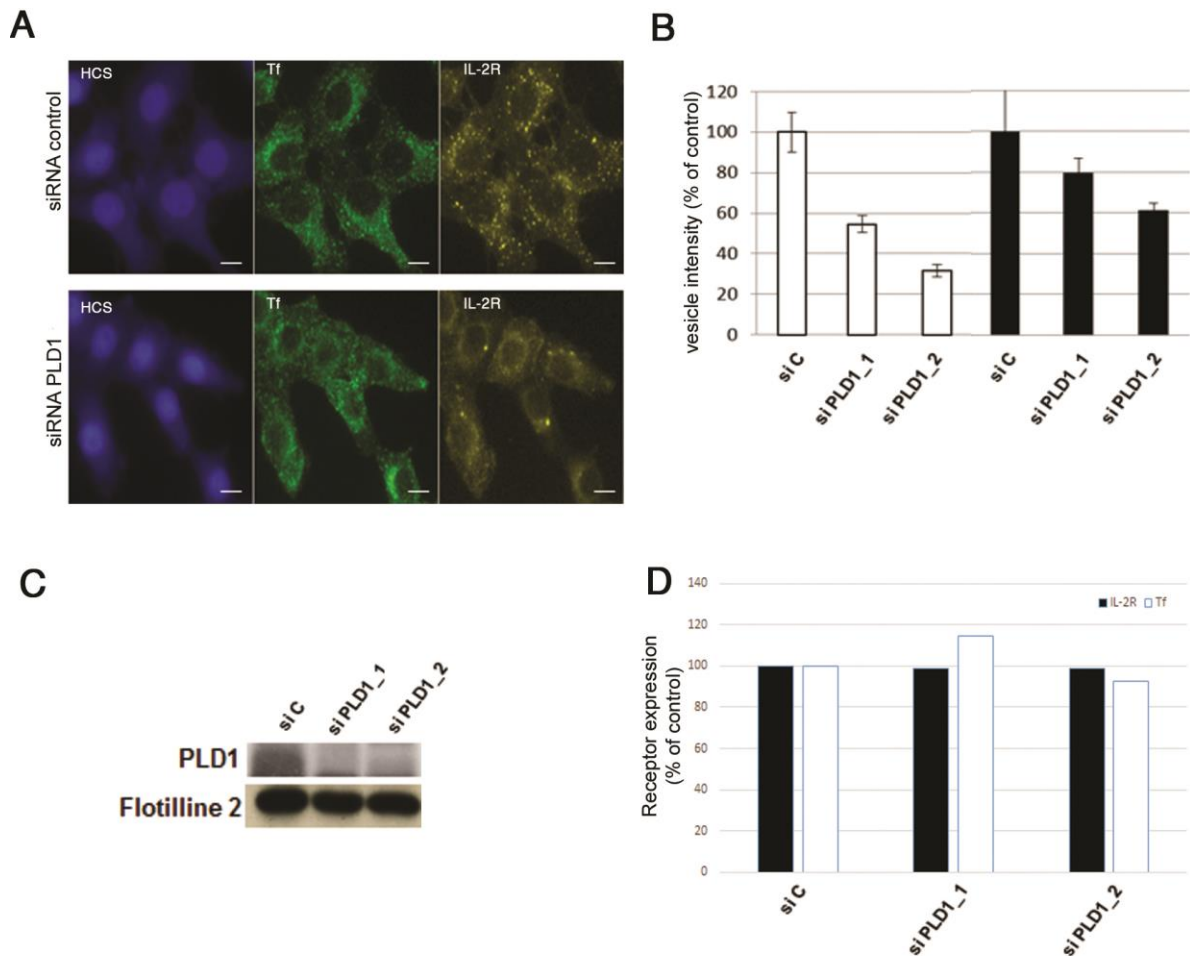


Figure 34 : PLD1 est impliquée spécifiquement dans l'endocytose de l'IL-2R

Les cellules Hep2 β ont été transfectées avec soit un siRNA contrôle (siC), soit deux siRNAs ciblant PLD1 (siPLD1_1, siPLD1_2) et analysées trois jours après transfection. (A) Les protéines cellulaires ont été extraites, déposées sur gel SDS-PAGE 8% et révélées par western blot avec un anticorps anti-PLD1 et Flotilline 2 (témoin de charge). (B) Les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-IL-2R (561-A647) et la transferrine (Tf-A488) pendant 40 minutes à 4°C (marquage de surface) et la fluorescence a été analysée par cytométrie en flux. La moyenne de la fluorescence par cellule est exprimée par rapport au contrôle. (C) Les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-IL-2R (561-Cy3) et la transferrine (Tf-A488) pendant 15 minutes à 37°C pour suivre l'endocytose. Après fixation, le cytosol et le noyau ont été marqués par du HCS. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence avec un objectif 20X. La barre d'échelle représente 10 μ m. (D) La quantification de l'endocytose de l'IL-2R a été réalisée avec les images d'immunofluorescence décrites en (C) en utilisant le logiciel ICY pour obtenir l'intensité de fluorescence des endosomes. La moyenne de l'intensité des endosomes a été calculée sur au moins 150 cellules et exprimée par rapport au contrôle.

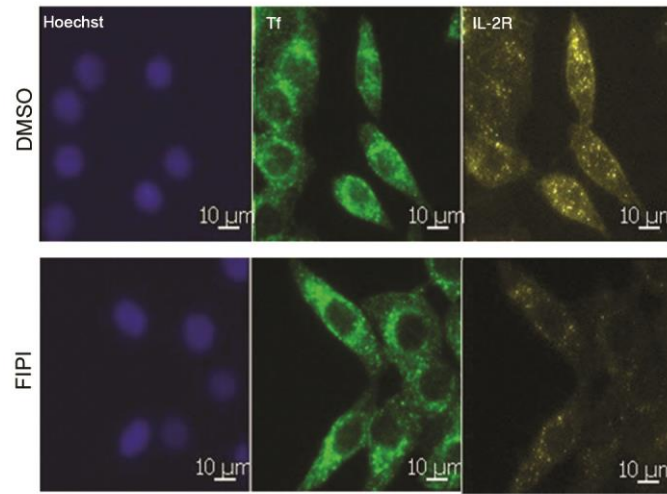
En conclusion, PLD1 est nécessaire pour l'entrée de l'IL-2R mais son rôle dans la voie clathrine est moins clair à ce stade.

Afin de tester le rôle de l'activité catalytique de PLD1, nous avons utilisé un inhibiteur le 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI). Les cellules sevrées puis traitées soient par du DMSO (contrôle), soient par du DMSO pendant 30 minutes à 37°C. Les images ont été acquises avec un microscope à épifluorescence (Figure 35A). Ces images ont été utilisées pour quantifier l'effet de cet inhibiteur sur l'endocytose de l'IL-2R et de la transferrine par immunofluorescence (Figure 35). La figure 35 montre une diminution de l'internalisation de l'IL-2R dans les cellules traitées par FIPI comparée aux cellules contrôles. En revanche, l'entrée de la transferrine ne semble pas être affectée. La quantification de la fluorescence des endosomes montre environ 60 % d'inhibition de l'endocytose de l'IL-2R dans les cellules traitées par FIPI comparée aux cellules traitées par DMSO (Figure 35).

Ainsi, un inhibiteur de l'activité catalytique des phospholipases affecte fortement l'endocytose de l'IL-2R. Ces résultats (siRNAs, FIPI) montrent que la phospholipase D1 est spécifiquement impliquée dans l'internalisation de l'IL-2R et que son activité hydrolase semble également requise.

J'ai voulu tester si le PA colocalisait avec l'IL-2R sur des cellules fixées ainsi qu'en dynamique en utilisant la microscopie TIRF. J'ai utilisé les sondes reconnaissant le PA (don de Nicolas Vitale Spo20, PABD ... (Kassas et al., 2012)) et de Sergio Grinstein : GFP-2PABD, (Bohdanowicz et al., 2013)). Les sondes de la figure 36 A et F étaient les seuls à se localiser au niveau de la membrane plasmique, les autres sondes ciblant le PA intracellulaire et marquant essentiellement le PA des organelles. Cependant, aucune des sondes PA que j'ai testé ne m'ont permis d'observer son recrutement à la membrane plasmique avec l'IL-2R (Figure 36).

A



B

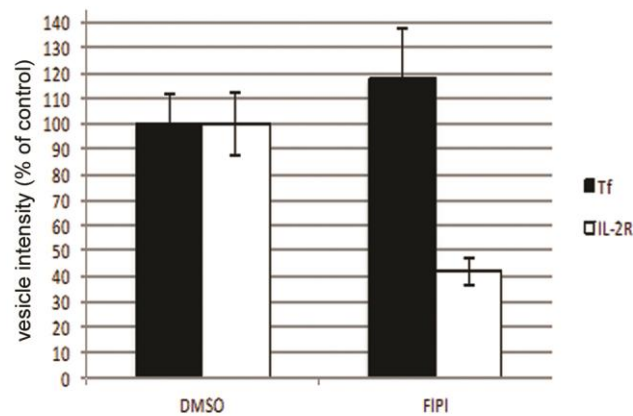


Figure 35 : Importance de l'activité catalytique de la phospholipase D dans l'endocytose de l'IL-2R

(A) Les cellules Hep2β ont été sevrées 30 minutes puis incubées dans du DMEM contenant du DMSO (contrôle) ou FIPI (une drogue inhibant l'activité catalytique de la phospholipase D) pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes à 37°C avec un anticorps dirigé contre la transferrine (Tf-A488) et contre l'IL-2R (561-CY3). Après fixation, le cytosol et le noyau ont été marqués par du HCS. Les images ont été acquises avec un microscope à fluorescence au 20X. (B) La quantification de l'endocytose de l'IL-2R et de la transferrine a été réalisée avec les images d'immunofluorescence décrites en (A), en utilisant le logiciel ICY pour obtenir l'intensité de fluorescence des endosomes.

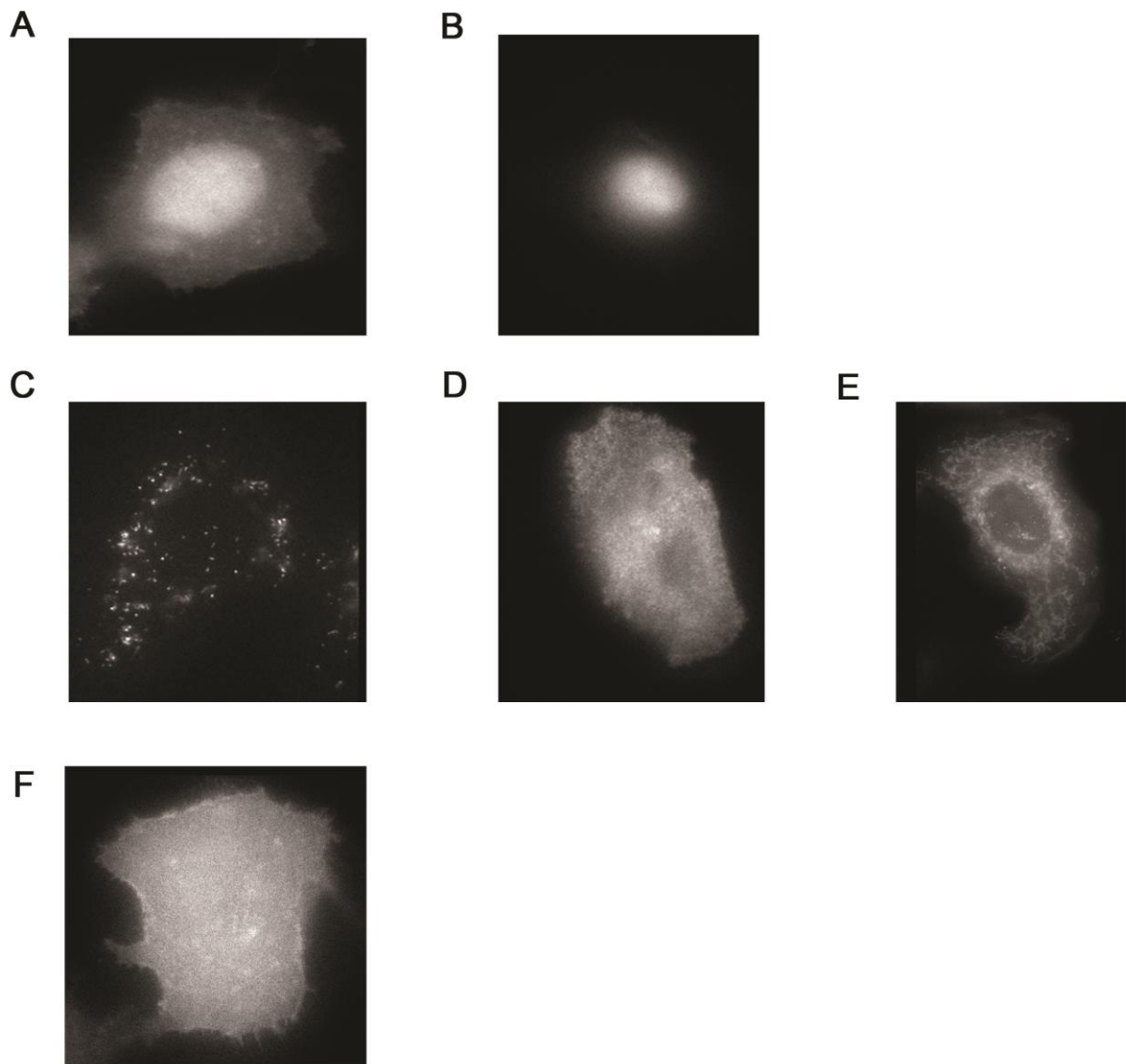


Figure 36 : Difficultés d'observation de l'acide phosphatidique dans les cellules Hep2 β
Toutes les images présentes dans cette figure ont été prises en épifluorescence.

(A) Image représentant la transfection transitoire dans des cellules Hep2 β de Spo20 WT, une construction reconnaissant spécifiquement l'acide phosphatidique (Don de Nicolas Vitale).

(B) Image illustration des cellules Hep2 β qui ont été transfectées transitoirement par un mutant de Spo20WT qui ne reconnaît plus l'acide phosphatidique (Don de Nicolas Vitale).

(C, D, E) Un exemple d'images de la transfection transitoire dans les cellules Hep2 β de mTOR (C) ou de la neurogranine (D) ou de PDE41A (E), trois sondes se liant spécifiquement à l'acide phosphatidique intracellulaire provenant des organelles (Don de Nicolas Vitale).

(F) La transfection dans des cellules Hep2 β de la sonde PASS-GFP, une forme modifiée de Spo20 (don de Sergio Grienstein), est illustrée en (F)

iv. L'endophiline A1, A2 et B2

a. Importance de l'endophiline A1, A2 et B2 dans la voie constitutive

Il existe 5 endophilines exprimées chez les mammifères : l'endophiline A1, A2, A3, B1 et B2.

Le crible a souligné l'importance de deux d'entre-elles, l'endophiline A1 et B2. J'ai ainsi commencé par vérifier l'implication de l'endophiline A1.

– L'endophiline A1

Deux siRNAs spécifiques de l'endophiline A1 (siEndoA1_1, siEndoA1_2) et un siRNA contrôle (siC, ne ciblant pas de gène) ont été utilisés, et introduits par transfection dans les cellules épithéliales humaines exprimant stablement l'IL-2R β , Hep2 β (Matériel et Méthodes). Après 72h de transfection, les protéines cellulaires ont été extraites et déposées sur gel SDS-PAGE, puis analysées en western blot avec des anticorps dirigés contre l'endophiline A1 et contre la flotilline 2, pour contrôler la quantité de protéine totale (Figure 37C). Nous observons une déplétion spécifique de l'endophiline A1 dans les cellules transfectées avec si EndoA1_1, siEndoA1_2 (Fig. 37C).

L'expression à la surface cellulaire des récepteurs à l'IL-2R et à la transferrine (Tf) a également été analysée en utilisant la cytométrie en flux (Figure 37D). Pour cela, les cellules Hep2 β déplétées ou non de l'endophiline A1 ont été incubées à 4°C avec un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de la chaîne β de l'IL-2R (561) couplé à l'Alexa 647 (561- A647) et avec de la transferrine couplée à l'Alexa 488 (Tf-A488). La fluorescence des cellules suivie en cytométrie a permis d'observer que la quantité d'IL-2R β à la surface cellulaire n'était pas modifiée par la transfection des siRNAs (effet inférieur à 20 %). De même, les siRNAs siEndoA1_1, siEndoA1_2 n'ont pas d'effet significatif sur la quantité du récepteur à la transferrine (TfR) (Figure 37D). Parallèlement, l'endocytose de l'IL-2R et de la transferrine ont

été testées et quantifiées par immunofluorescence et analysées par ICY. Les cellules Hep2 β déplétées ou non pour l'endophiline A1 ont été incubées avec l'anti-IL-2R couplé à la cyanine 3 (561-Cy3) et avec la Tf-A488 pendant 7 minutes et 15 minutes à 37°C pour permettre leur endocytose. La cinétique d'endocytose de la transferrine est plus rapide que celle de l'IL-2R. Après fixation des cellules, le cytoplasme et le noyau des cellules ont été marqués au HCS et Hoechst afin de permettre la segmentation automatique des cellules avec notre logiciel ICY. Les images l'immunofluorescence ont été prises avec un objectif 20X en champs large. Un exemple est montré pour les cellules traitées avec le siC et le siEndoA1_1 (Figure 37A). La figure 37A montre une diminution de l'internalisation de l'IL-2R dans les cellules Hep2 β déplétées de l'endophiline A1. En revanche, l'entrée de la Tf ne semble pas affectée. La quantification de la fluorescence des endosomes montre entre 50% et 60% d'inhibition de l'endocytose de l'IL-2R dans les cellules traitées avec siEndoA1_1 ou siEndoA1_2 comparée aux cellules traitées par siC (Figure 37B). En revanche, les deux siRNAs (siEndoA1_1, siEndoA1_2) n'ont pas effet significatif sur l'entrée dépendante de la clathrine suivie par la transferrine (Figure 37B).

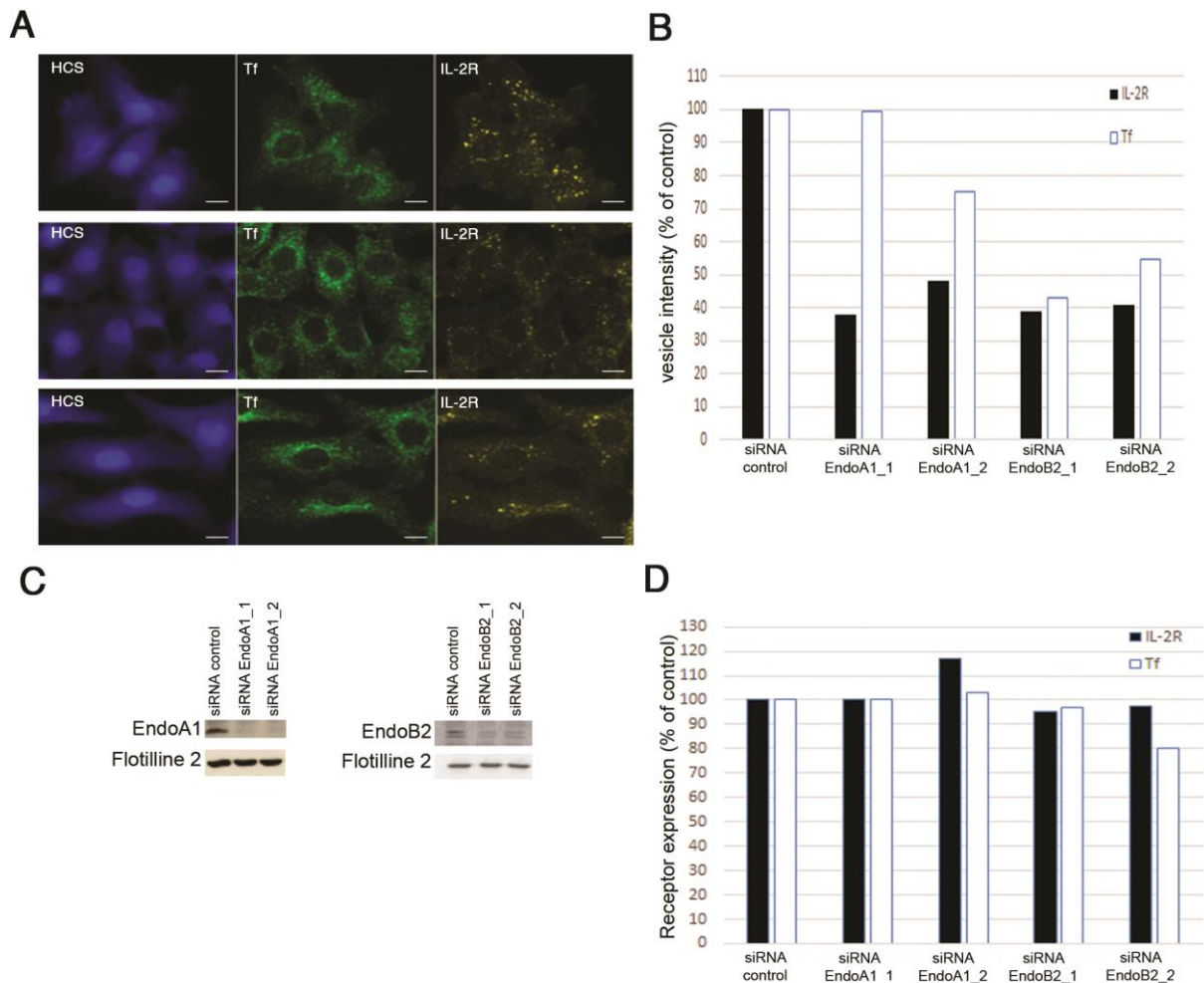


Figure 37 : L'endophiline A1 et B2 sont impliquées dans l'endocytose de l'IL-2R

Les cellules Hep2 β ont été transfectées avec soit un siRNA contrôle (siC), soit deux siRNAs ciblant l'endophiline A1 (siEndoA1_1, siEndoA1_2), soit deux siRNAs dirigés contre l'endophiline B2 (siEndoB2_1, siEndoB2_2) et analysées trois jours après transfection. (A) Les protéines cellulaires ont été extraites, déposées sur gel SDS-PAGE 10% et révélées par western blot avec un anticorps anti-EndoA1 ou anti-EndoB2 et Flotilline 2 (témoin de charge). (B) Les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-IL-2R (561-A647) et la transferrine (Tf-A488) pendant 40 minutes à 4°C (marquage de surface) et la fluorescence a été analysée par cytométrie en flux. La moyenne de la fluorescence par cellule est exprimée par rapport au contrôle. (C) Les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-IL-2R (561-Cy3) et la transferrine (Tf-A488) pendant 15 minutes à 37°C pour suivre l'endocytose. Après fixation, le cytosol et le noyau ont été marqués par du HCS. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence avec un objectif 20X. La barre d'échelle représente 10 μ m. (D) La quantification de l'endocytose de l'IL-2R et de la transferrine a été réalisée avec les images d'immunofluorescence décrites en (C), en utilisant le logiciel ICY pour obtenir l'intensité de fluorescence des endosomes. La moyenne de l'intensité des endosomes a été calculée sur au moins 150 cellules et exprimée par rapport au contrôle.

Ainsi, deux siRNAs déplétant spécifiquement l'endophiline A1 inhibent fortement l'endocytose de l'IL-2R sans affecter celle de la transferrine. Ces résultats montrent que l'endophiline A1 est spécifiquement requise dans l'endocytose indépendante de la clathrine.

– L'endophiline B2

Deux siRNAs spécifiques de l'endophiline B2 (siEndoB2_1, siEndoB2_2) et un siRNA contrôle (siC) ont été utilisés, et introduits par transfection dans les cellules Hep2β (Matériel et Méthodes). Après 72h de transfection, les protéines cellulaires ont été extraites et déposées sur gel SDS-PAGE, puis analysées en western blot avec des anticorps dirigés contre l'endophiline B2 et contre la flotilline 2 (Fig. 37C). Nous observons une déplétion spécifique de l'endophiline B2 dans les cellules transfectées avec les siEndoB2_1, siEndoB2_2 (Fig. 37C).

Comme décrit précédemment, l'expression à la surface cellulaire des récepteurs à l'IL-2 et à la transferrine a été analysée (Fig. 37D). La fluorescence des cellules suivie en cytométrie a permis d'observer que la quantité d'IL-2Rβ et de TfR à la surface cellulaire n'était pas modifiée par la transfection des siRNAs siEndoB2_2 et siEndoB2_3 (effet inférieur à 20 %).

Parallèlement, l'endocytose de l'IL-2R et de Tf ont été suivies et quantifiées en incubant les cellules Hep2β, déplétées ou non pour l'endophiline B2, avec l'anticorps 561-Cy3 et la Tf-A488 pendant 7 minutes et 15 minutes à 37°C. Après fixation des cellules, le cytoplasme et le noyau des cellules ont été marqués au HCS et Hoechst. Un exemple d'image d'immunofluorescence est montré pour les cellules traitées avec le siC et le siEndoB2_2 (Fig. 37A). La figure 37A montre une diminution de l'internalisation de l'IL-2R et de la transferrine dans les cellules Hep2β déplétées de l'endophiline B2. La quantification de l'endocytose de l'IL-2R montre qu'il y a environ 60% d'inhibition dans les cellules traitées avec siEndoB2_1, siEndoB2_2 comparée aux cellules traitées avec siC (Fig. 37A). La quantification de l'entrée

de la transferrine montre siEndoB2_2 a un effet inhibiteur, autour de 40% et de 60% pour siEndoB2_1 (Fig. 37B).

Ainsi, les deux siRNAs déplétant spécifiquement l'endophiline B2 inhibent tous l'endocytose de l'IL-2R ainsi que celle de la Tf. Ces résultats montrent que l'endophiline B2 est impliquée dans l'entrée dépendante et indépendante de la clathrine.

– L'endophiline A2

L'importance de l'endophiline A2 dans l'endocytose constitutive de l'IL-2R a été vérifié à l'aide d'un smart pool de quatre siRNAs dirigés contre l'endophiline A2 ou un siRNA contrôle (siC). Trois jours après transfection, les protéines cellulaires ont été extraites et déposées sur gel SDS-PAGE, puis analysées en western blot avec des anticorps spécifiques de l'endophiline A2 et la Flotilline 2 (Figure 38). La figure 38B montre que la déplétion de l'endophiline A2 n'affecte pas le niveau d'expression à la surface des deux récepteurs.

Nous observons une déplétion spécifique de l'endophiline A2 dans les cellules transfectées avec le smart pool. En parallèle, l'endocytose de l'IL-2R et de la transferrine ont été étudiées par incubation des anticorps Tf-A488 et 561-CY3 pendant 7 et 15 minutes respectivement à 37°C.

Puis, les cellules ont été fixées, marquées en HCS et Hoechst comme précédemment décrit. Un exemple d'image d'immunofluorescence est montré (Figure 38A).

La quantification des images montre que l'endophiline A2 est impliquée dans l'endocytose de l'IL-2R (effet inhibiteur de 60%, Figure 38B).

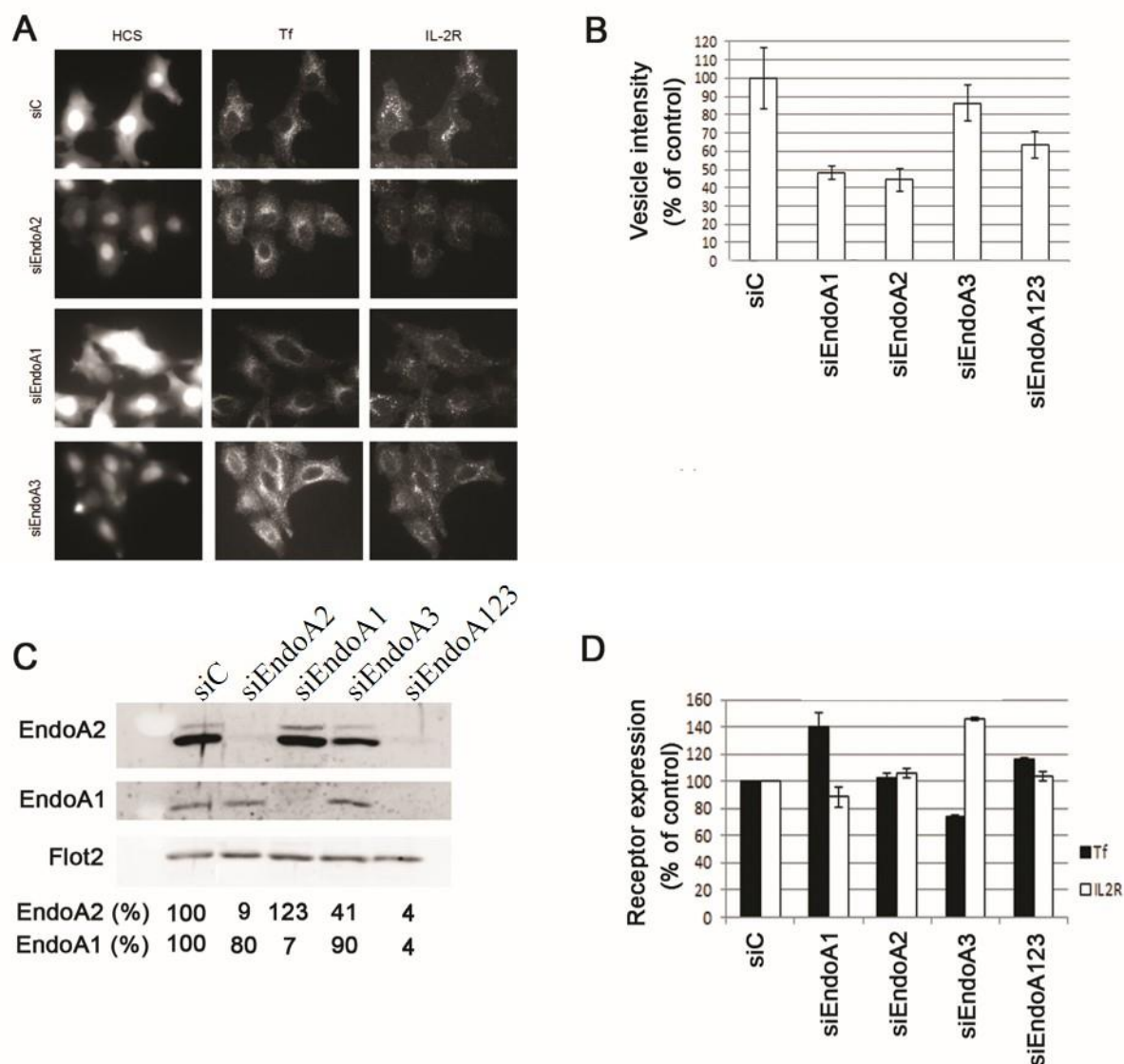


Figure 38 : L'endophiline A2 est impliquée dans l'endocytose de l'IL-2R

Les cellules Hep2 β ont été transfectées avec soit un siRNA contrôle (siC), soit un assortiment de 4 siRNAs ciblant l'endophiline A2 (siEndoA2) et analysées trois jours après transfection. **(A)** Les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-IL-2R (561-Cy3) et la transferrine (Tf-A488) pendant 15 minutes à 37°C pour suivre l'endocytose. Après fixation, le cytosol et le noyau ont été marqués par du HCS. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence avec un objectif 20X. La barre d'échelle représente 10 μ m. **(B)** La quantification de l'endocytose de l'IL-2R a été réalisée avec les images d'immunofluorescence décrites en (A) en utilisant le logiciel ICY pour obtenir l'intensité de fluorescence des endosomes. La moyenne de l'intensité des endosomes a été calculée sur au moins 150 cellules et exprimée par rapport au contrôle. **(C)** Les protéines cellulaires ont été extraites, déposées sur gel SDS-PAGE 10% et révélées par western blot avec un anticorps anti-EndoB2 et Flotilline 2 (témoin de charge). **(D)** Les cellules ont été incubées avec les anticorps anti-IL-2R (561-A647) et la transferrine (Tf-A488) pendant 40 minutes à 4°C (marquage de surface) et la fluorescence a été analysée par cytométrie en flux. La moyenne de la fluorescence par cellule est exprimée par rapport au contrôle.

En conclusion, les endophilines A1, A2 et B2 sont impliquées dans le processus d'internalisation constitutive de l'IL-2R.

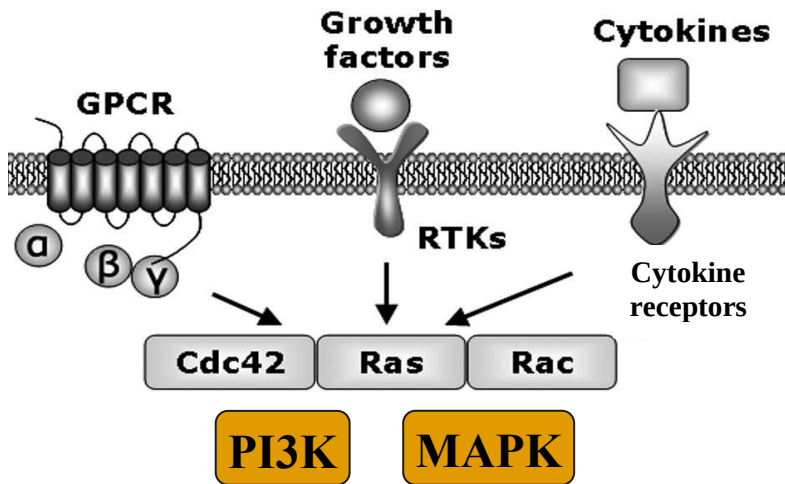
b. Importance de l'endophiline A2 dans la voie induite

La vérification de l'implication de l'endophiline A2 dans l'endocytose de l'IL-2R induite par le ligand IL-2 (Figure 40, Extended figure Figure 8 de l'article #1) fait partie d'une publication dont les références sont les suivantes :

Article #1 **Endophilin marks- and controls- clathrin independent pathway** (Boucrot et al., 2015) Emmanuel Boucrot, Antonio P. A. Ferreira, Leonardo Almeida-Souza, Sylvain Debard, Yvonne Vallis, Gillian Howard, Laetitia Bertot, Nathalie Sauvonnet & Harvey T. McMahon.

1. Résumé de l'article :

L'endocytose est un processus physiologique qui permet aux cellules de faire entrer des éléments extracellulaires comme des nutriments. L'endophiline, une protéine à domaine BAR pouvant courber les membranes, est considérée comme un des constituants de l'endocytose dépendante de la clathrine. Cet article montre que l'endophiline marque et contrôle une voie d'endocytose indépendante de la clathrine et d'AP2, générant des vésicules de formes tubulaires. Ce mécanisme d'endocytose nommée FEME pour « Fast Endophilin Mediated Endocytosis » nécessite la polymérisation d'actine, la dynamine, la PI3K, RhoA, Rac, PAK1 et le cholestérol. La lamellipodine est également requise pour le recrutement de l'endophiline A2 à la membrane plasmique. De nombreux cargos empruntent cette voie tels que les récepteurs de type tyrosines kinases (EGFR, HGFR, VEGFR, PDGFR, NGFR et IGFR), quelques récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et l'IL-2R.



CARGOS

Cytokine receptors:
IL-2R, IL-15R...

GPCRs:

α_{2a} & β_1 -adrenergic receptors
Dopaminergic D3 & D4 receptors
Muscarinic acetylcholine receptor

Figure 39 : Les récepteurs empruntant la voie FEME

La voie FEME regroupe des récepteurs qui signalisent (récepteurs de cytokines, RTKs et quelques GPCR, (Boucrot et al., 2015)).

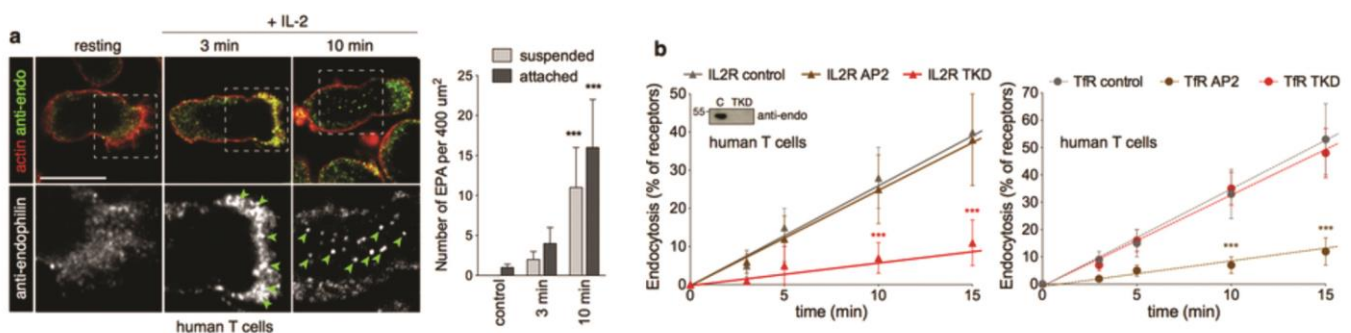


Figure 40: L'importance de l'endophiline dans l'endocytose induite de l'IL-2R

- (A) L'endophiline endogène colocalise avec l'IL-2R lors de l'endocytose induite par le ligand IL-2. Kit225 est une lignée lymphocytaire non adhérente (transmettant le signal IL-2) utilisée dans cette étude. Le nombre de « Endophilin-positive assemblies » EPAs augmente au cours du temps sous stimulation par l'IL-2 dans les cellules en suspension comme dans les cellules qui sont attachées par un traitement des lamelles à la polylysine.
- (B) L'absence de l'endophiline dans les cellules lymphocytaires Kit225 (Triple Knockdown, TKD) en présence du ligand affecte l'entrée de l'IL-2R mais pas l'internalisation de la transferrine (TfR, Boucrot et al., 2015).

Mon implication dans cette publication est liée au travail préliminaire réalisé sur l'importance de l'endophiline A2 au cours de l'endocytose constitutive de l'IL-2R (Figure 34). J'avais observé grâce à l'expression de la construction de l'endophiline A2 fusionnée à la GFP (Don d'Emmanuel Boucrot) que, dans les cellules Hep2 β (endocytose constitutive), l'endophiline A2 colocalisait au site d'endocytose de l'IL-2R ou celui de la transferrine. En revanche, l'endophiline A2 n'était pas indispensable dans la voie clathrine (siRNA) confirmant que l'endophiline est requise dans cette voie indépendante de la clathrine suivie par l'IL-2R.

2. Résultats complémentaires :

Par des techniques de GST-pull down ou de co-IP, l'interaction directe ou indirecte de l'endophiline avec l'IL-2R a été testée mais n'a pas permis d'observer des résultats reproductibles (résultats personnels et communication personnelle d'Emmanuel Boucrot).

L'endophiline et CBL sont nécessaires à l'endocytose de l'EGFR et celle de l'IL-2R (Figure 33). Dans le cas de l'EGFR, le recrutement de CBL conduit à celui de « CBL interacting protein 85 » CIN85 et l'endophiline A1 (Soubeyran et al., 2002). J'ai ainsi testé l'importance de CIN85 dans l'endocytose constitutive de l'IL-2R β en utilisant un mutant dominant négatif de ce facteur mais aucune inhibition n'a été observée. En conclusion, CIN85 ne serait pas requise pour l'entrée de l'IL-2R.

Le recrutement de l'endophiline dans la voie FEME et la voie constitutive de l'IL-2R est différent. Dans l'article #1, la lamellipoline colocalise et interagit directement dans la cellule avec l'endophiline ((Vehlow et al., 2013), (Boucrot et al., 2015)). La déplétion de la lamellipodine conduit à une forte diminution de la présence de l'endophiline à la membrane plasmique, la protéine devenant alors cytosolique (Boucrot et al., 2015). Inversement, l'absence d'endophiline n'affecte pas la présence de la lamellipodine confirmant que cette dernière recruterait l'endophiline au site d'endocytose (Boucrot et al., 2015). Cependant, dans la voie

constitutive de l'IL-2R, la déplétion de la lamellipodine par siRNA n'affectait pas l'internalisation de l'IL-2R (résultats non publiés de Nathalie Sauvonnet).

II. Rôle de l'endophiline A2 dans l'endocytose suivie par les récepteurs de cytokines

Parmi ces trois isoformes, l'endophiline A2 est la seule qui soit ubiquitaire. Aussi, nous avons choisi de nous focaliser sur l'importance et le rôle de cette isoforme dans l'entrée de l'IL-2R. Les données relatives à cette partie donne matière à l'écriture d'un second article en cours de préparation dont les références actuelles seraient : Article #2 **Dynamin and endophilin have distinct orchestrations during clathrin-dependent and -independent endocytosis (titre provisoire, article en préparation)** Laetitia Bertot*, Alexandre Grassart*, Thibault Lagache*, Giacomo Nardi*, Jean-Christophe Olivo-Marin et Nathalie Sauvonnet

Cet article a nécessité la mise en place d'une collaboration avec Alexandre Grassart pour la production des cellules génomes éditées mais aussi avec Thibault Lagache et Giacomo Nardi pour la réalisation d'un module complémentaire permettant l'analyse des films avec le logiciel ICY et l'identification par statistique des différentes populations de tracks IL-2R ou clathrine.

Récemment, le développement de l'édition du génome des cellules a permis de se placer dans des conditions plus physiologique mais a compliqué la détection des points à cause du niveau de fluorescence beaucoup plus faible (Hong et al., 2015). Il a donc fallu développer des outils de détection plus performants pour faire une distinction entre du signal et du bruit (Technique Master et Slave, (Aguet et al., 2013)).

Pour analyser mes films, nous avons dû faire développer un programme informatique et des outils statistiques en collaboration avec le groupe de Jean Christophe Olivo-Marin parce que l'IL-2R se déplace en x, y et z et que l'analyse via les techniques communément utilisées conduisait à raccourcir la durée des tracks d'IL-2R (Figure 3 et S3 de l'article #2).

1. Résumé général :

L'endocytose indépendante de la clathrine suivie par l'IL-2R est une voie encore peu caractérisée, en particulier, au niveau de la dynamique de ce processus. Dans cet article, nous avons étudié l'orchestration de la dynamine et de l'endophiline dans la cellule pour la voie dépendante de la clathrine suivie par la transferrine et la voie indépendante de la clathrine empruntée par le récepteur de l'interleukine 2. Pour cela, nous avons édité le génome des cellules avec la technologie CRISPR/Cas9 (Knock-in) pour visualiser la clathrine, l'endophiline et la dynamine. Après analyse des films acquis en microscopie TIRF en live, nous avons identifié les tracks d'endocytose grâce à un module complémentaire (e-Track, Id ICY-R9Y9A8)) que nous avons développé pour permettre une étude sans biais. Pour finir, les populations présentes ont été déterminées par des outils mathématiques (BIC).

Nos résultats montrent que l'endophiline et la dynamine sont impliquées vers la fin du mécanisme aussi bien dans la voie dépendante de la clathrine (CME) que celle suivie par l'IL-2R (CIE). Toutefois, le recrutement de la dynamine est de l'ordre de 20 à 30 secondes dans la CME alors que dans l'endocytose CIE, le temps d'interaction est moins homogène (20 à 60 secondes). Nous avons observé un pic de recrutement de l'endophiline uniquement aux sites d'endocytose de l'IL-2R (20 à 30 secondes).

De plus, en utilisant des siRNAs, nous avons vu que l'endophiline est nécessaire pour un recrutement efficace de la dynamine au site actif d'endocytose de l'IL-2R, ce qui n'est pas le cas dans la voie CME. La dynamine contrôle le départ de l'endophiline dans les deux voies. Nos données montrent que ces deux facteurs n'ont pas la même orchestration entre la voie CME et CIE suggérant deux actions distinctes de ces deux protéines dans la voie CME et CIE.

Dans l'article #2, j'ai confirmé l'importance de l'endophiline A2 dans l'endocytose constitutive de l'IL-2R (Figure 1 de l'article #2) puis étudié la colocalisation de l'endophiline A2 avec l'IL-

2R à l'aide d'une construction de l'endophiline A2 fusionnée à la GFP. J'ai observé que la surexpression de la construction dans les cellules conduisait à un comportement aberrant de l'endophiline A2 (Figure S1 de l'article #2) ce qui nous a amené à modifier notre approche et à choisir d'éditer le génome des cellules Hep2 β avec l'aide d'Alexandre Grassart pour obtenir des clones Hep2 β EndoA2-GFP (Figure 2 de l'article #2). J'ai ainsi vérifié que l'édition du génome n'affectait pas l'endocytose de l'IL-2R et que l'endophiline se comportait comme la forme non éditée (Figure 40 et Figure 2 de l'article #2).

J'ai également cultivé les lignées cellulaires, réalisé les transfections siRNAs des cellules puis acquis en microscopie TIRF une vingtaine de films par condition (soit 180 films environ) avant de les pré-analyser à l'aide du logiciel ICY (E-Track, Id ICY-R9Y9A8). La compilation a ensuite été étudiée indépendamment en utilisant une analyse statistique apportant une robustesse à notre étude par Giacomo Nardi et Thibault Lagache.

2. Détail sur l'article #2

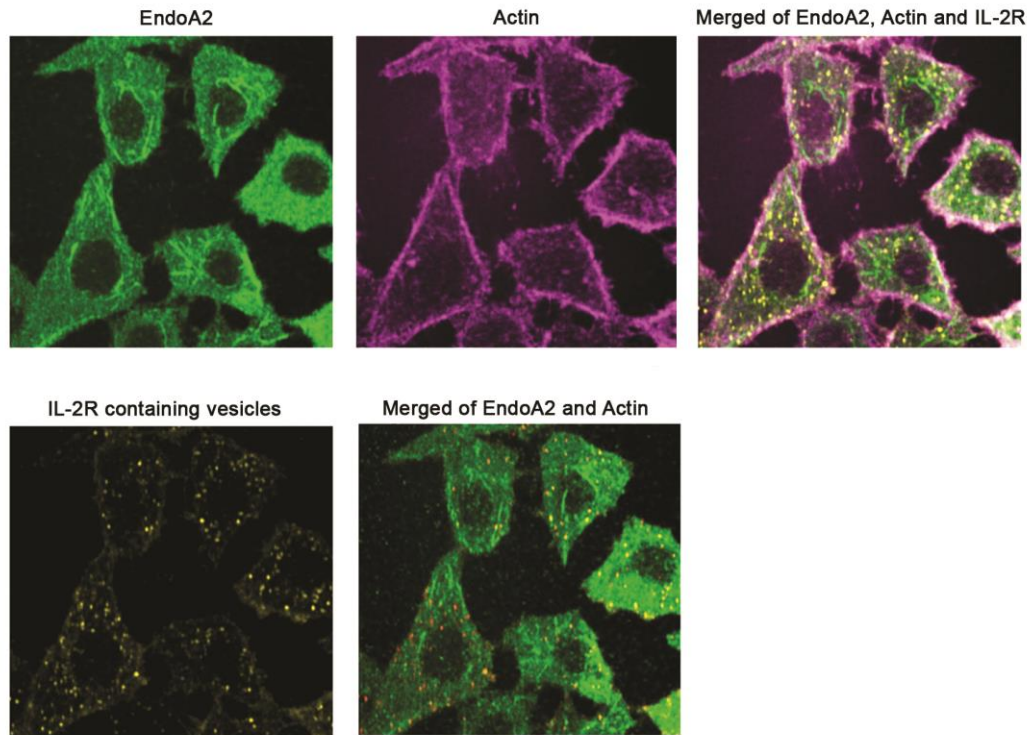
➤ Production de cellules Hep2 β EndoA2-GFP^{EN}

Après avoir montré que l'endophiline A2 était impliquée dans l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline suivie par l'IL-2R (Figure 1 de l'article #2), nous avons travaillé en surexpression de l'endophiline A2 avec une construction fusionnée à la GFP (don d'Emmanuel Boucrot). Malheureusement, en épifluorescence, la surexpression de l'endophiline A2 dans les cellules Hep2 β conduisait à la formation d'agrégats dans le cytoplasme (Figure S1 de l'article #2) et les études TIRF en live difficile à interpréter. En effet, les films avaient un rapport signal /bruit trop faible pour pouvoir permettre une détection automatique correcte de l'endophiline à la membrane plasmique. De plus, l'étude du recrutement n'était pas possible en surexpression puisque l'endophiline restait associée à la membrane plasmique pendant toute la durée des films (600 secondes). En outre, le nombre de « spots » d'endophiline était peu nombreux en

surexpression (Figure S1 de l'article #2), possiblement à cause de la formation des agrégats. De plus, les structures filamenteuses observées en visualisant l'endophiline endogène ne sont pas présente en surexpression (Figure S1 de l'article #2). Toutes ces raisons nous ont conduites à poursuivre notre étude, en réalisant des cellules éditées pour l'endophiline A2-GFP (Figure 2 de l'article #2).

La technique d'édition du génome par knock-in consiste à insérer directement une séquence, par exemple celle qui encode la GFP, dans le génome au locus d'intérêt. Cela permet de se placer dans un contexte plus physiologique, puisque contrairement à la surexpression, la protéine endogène ne s'exprime que si la cellule en a besoin. Grace à une collaboration avec Alexandre Grassart, j'ai pu éditer l'endophiline en position C-ter à l'aide du système CRISPR/Cas9 dans une lignée de cellulaire Hep2 exprimant stablement la chaîne β de l'IL-2R. Pour cela, nous avons produit un plasmide possédant un guide (Figure 2 de l'article #2) reconnaissant spécifiquement le gène codant pour l'endophiline A2. La Cas9 va couper dans cette séquence au niveau du « Protospacer Adjacent Motif » PAM. Un second plasmide comprenant la séquence ADN de la protéine suivie ici de la GFP est co-introduit pour forcer la cellule à l'utiliser comme matrice réparatrice (recombinaison homologue). La sélection de ces clones se fait par tri cellulaire puis une vérification des clones est faite par « Polymerase Chain Reaction » PCR, par séquençage et western blot mais aussi par immunofluorescence et en microscopie *en live* pour observer la localisation et la dynamique de la fusion protéique générée. La dynamique des cellules endophiline A2 génomes éditées a été étudiée (Figure 41). La durée de vie moyenne de l'endophiline A2 est de quelques dizaines de secondes soit bien plus dynamique que dans la surexpression.

A



B

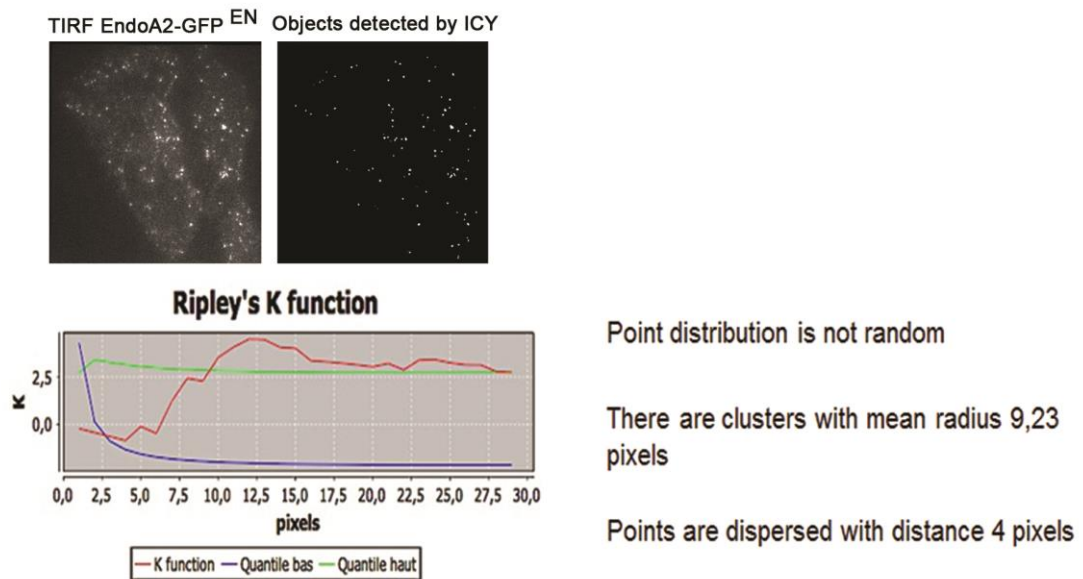


Figure 41 : Particularités des cellules Endophiline A2 génome éditées

- (A) Images prises avec un microscopie confocale (Opterra) de l'endophiline A2, de l'actine et de l'IL-2R au cours de l'endocytose constitutive (15 minutes à 37°C en présence de 561-CY3 puis marquées après fixation avec la phalloïdine couplée à l'alexa 647).
- (B) La répartition de l'endophiline A2 à la membrane plasmique (Photo prise en TIRF, détection à droite à l'aide du logiciel ICY) n'est pas uniforme, ni aléatoire et témoigne de la présence de cluster (plug-in de Thibault Lagache nommé « Spatial Analysis », Id ICY-P2C9P5)

L'observation de ces cellules montre la présence des deux structures : des tubules et des « clusters » (Figure 23). L'analyse par le plug-in « spatial analysis » développé par Thibault Lagache (Publication Id ICY-P2C9P5) montre la présence de cluster d'une taille de 10 pixels de rayon (1 pixel correspondant à environ 80 nm, Figure 41).

J'ai voulu étudier le rôle de ces deux structures dans l'endocytose de l'IL-2R. Pour les tubules, on sait qu'ils sont associés aux vésicules. J'ai observé la colocalisation de l'endophiline avec l'IL-2R mais j'ai également pu constater que les vésicules d'IL-2R n'étaient pas systématiquement associées à ces structures (Figure 41). Il serait intéressant de quantifier le pourcentage de colocalisation et de voir si cela augmenterait dans la voie induite par l'IL-2, la colocalisation de l'IL-2R avec l'endophiline comme cela a été décrit dans l'article #1 (Boucrot et al., 2015).

En revanche, il n'est pas simple d'automatiser cette analyse de part la dynamique très transitoire des tubules, de leur présence dans différents plans de la cellule (confocal) et de la difficulté d'analyser la colocalisation entre une structure filamenteuse avec une autre de type ponctiforme.

L'étude du recrutement de l'endophiline A2 dans les Kit225 pourrait apporter des informations supplémentaires quant au rôle de cette dernière dans la voie induite par le ligand IL-2. Malheureusement, cette lignée de cellules est difficile à obtenir car ces cellules sont peu transfectables rendant l'édition du génome délicate. Dans le cadre de la collaboration avec Alexandre Grassart, nous essayons de trouver des conditions optimales pour nous permettre de les éditer.

➤ **Identification de la population active de l'IL-2R et de la clathrine**

Après la validation de notre lignée cellulaire, nous avons commencé à étudier la dynamique de l'IL-2R et de la clathrine. Nous avons extrait les tracks d'IL-2R et de clathrine grâce au module eTrack d'ICY (Figure 42). Nous avons superposé les tracks colocalisés et non colocalisés de l'IL-2R avec l'endophiline ou la dynamine (Figure 3 de l'article #2) et observé une différence entre ces deux répartitions. Dans les non colocalisés les durées de vie suivent une courbe exponentielle décroissante et dans les colocalisés, en plus de l'exponentiel décroissante, on observe plusieurs gaussiennes. A l'aide du « Bayesian Information Criterion » (BIC), une méthode d'analyse mathématique, nous avons pu définir deux populations, la première centrée sur 135 secondes, la seconde population centrée sur 578 secondes. La déplétion de la dynamine montre que la première population diminue au profit de la seconde. Cela nous a permis de déterminer que la population 1 correspond à la population des tracks actifs alors que la population 2 correspondait à des tracks immobiles (Figure 5 de l'article #2). Dans la voie clathrine, nous avons différencié, en utilisant la même démarche, la présence de quatre populations dont la durée moyenne est de 92, 142, 236 et 294 secondes respectivement (Figure 4 de l'article #2). Lors de la déplétion de la dynamine, nous avons observé la diminution de la population 1 au profit des populations 2, 3 et 4 montrant ainsi que la première population est celle des tracks actifs.

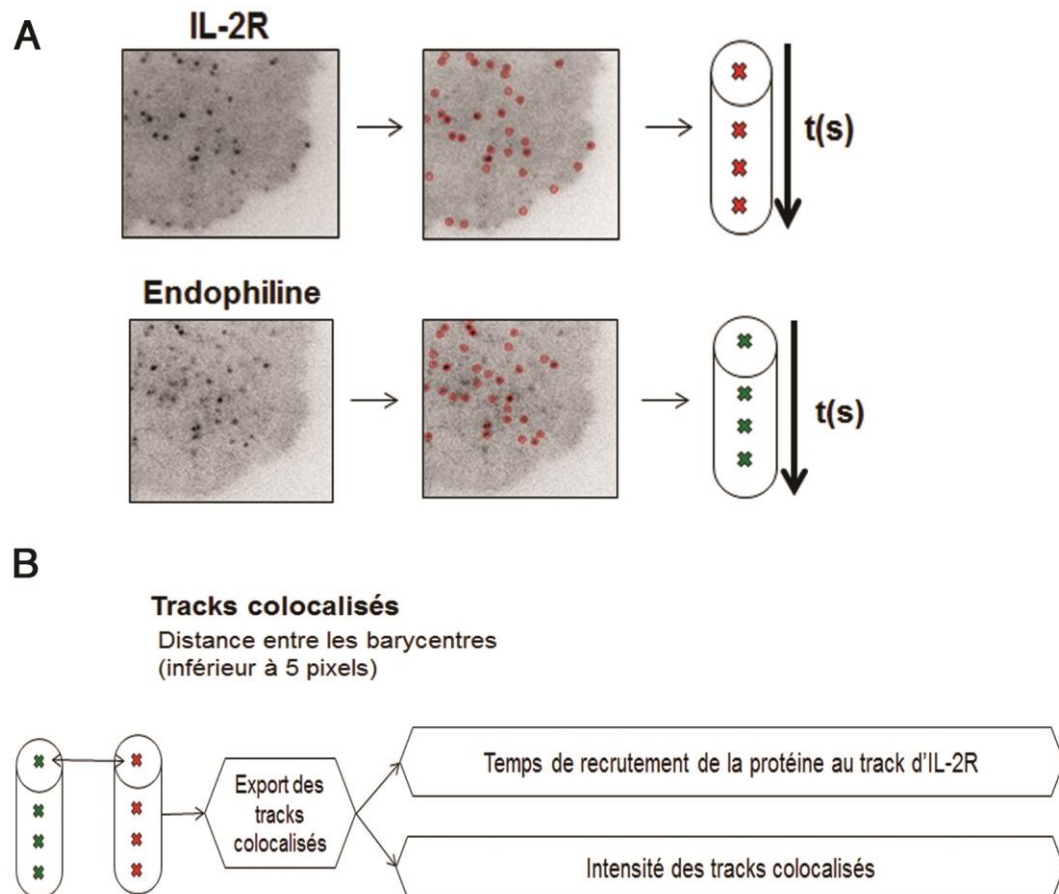


Figure 42: Protocole d'analyse des films acquis au TIRF

- (A) Détection des spots sur l'image de gauche avec le module « Spot detector » (cercle rouge sur l'image de droite) du logiciel ICY au cours du temps dessinant des tubes (croix rouges ou vertes, tracks) pour des coordonnées (x ; y) données.
- (B) Le module « eTrack » permet d'identifier les tracks colocalisés définis comme ayant leur barycentre distant de moins de 5 pixels. Nous pouvons ensuite connaître le temps de recrutement de la protéine d'intérêt (Endophiline, Dynamine) avec le track d'IL-2R ou de la clathrine et récupérer les intensités de fluorescence des deux tracks.

➤ **Recrutement de l'endophiline et de la
dynamine au cours de l'endocytose
constitutive de l'IL-2R**

La dynamine étant capable d'interagir avec l'endophiline, l'effet de la déplétion de la dynamine 2 (repère de la fission de la vésicule) sur le recrutement et la dynamique de l'endophiline A2 a été analysé par siRNA.

L'endophiline colocalise avec l'IL-2R et la clathrine à 60% et 36% respectivement (Figure 6 de l'article #2). La déplétion de la dynamine entraîne une augmentation du pourcentage de colocalisation dans les deux voies (94% et 38% respectivement) qui n'est pas significative pour la voie suivie par l'IL-2R et qui pourrait être significative dans la voie clathrine ($p=0.0576$). Quant à la dynamine 2, elle colocalise avec la clathrine et l'IL-2R à hauteur de 80% et 60% respectivement. La déplétion de l'endophiline A2 entraîne une diminution significative du pourcentage de colocalisation (40%) de la dynamine avec l'IL-2R ($p=0.0142$).

Nous avons ensuite étudié le temps de colocalisation de la clathrine avec la dynamine 2 (pic de 24 secondes) et de la clathrine avec l'endophiline A2. La déplétion de l'endophiline A2 n'affecte pas le temps de colocalisation de la dynamine avec la clathrine. En revanche, en absence de dynamine 2, l'endophiline A2 reste associée à la clathrine. Le temps de colocalisation de l'endophiline A2 (30 à 40 secondes) et de la dynamine 2 (20 à 60 secondes) avec l'IL-2R a été également étudié. La déplétion de l'endophiline A2 conduit à un temps de recrutement de plus long et plus aléatoire de la dynamine et la déplétion de la dynamine 2 bloque le départ de l'endophiline A2.

En conclusion, le recrutement de des deux protéines dans ces deux voies sont tardives (dernier tiers du mécanisme) et leur départ se produit majoritairement au moment de la disparition de la vésicule du plan TIRF.

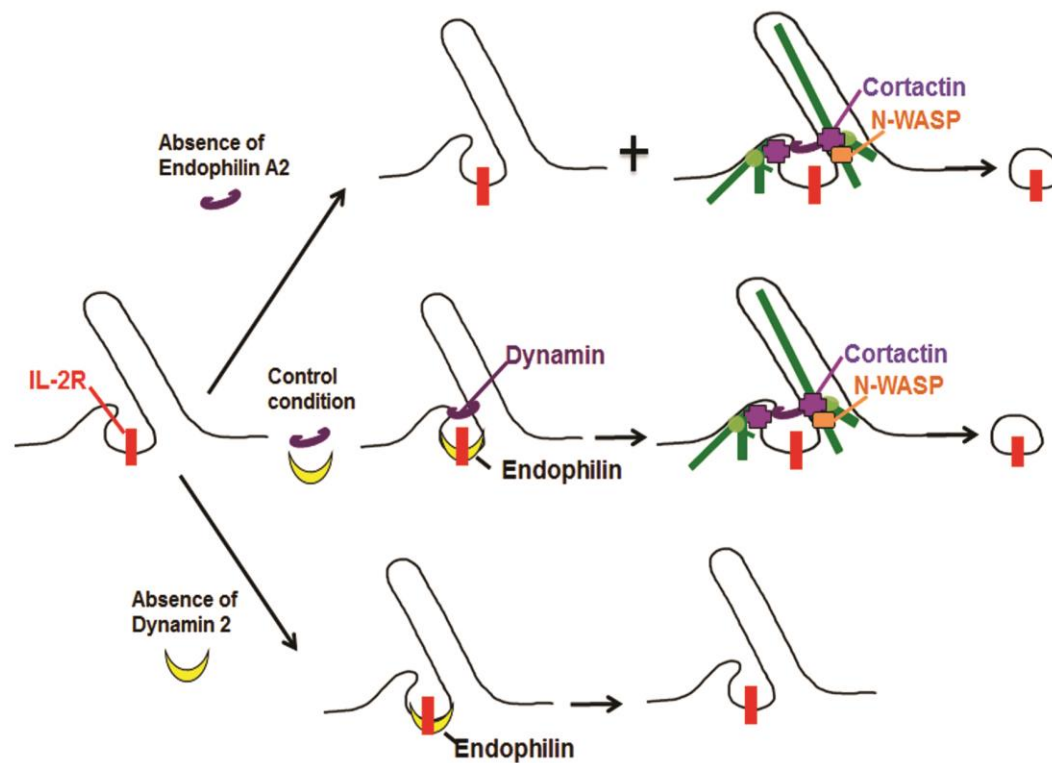


Figure 43 : Schéma résumant les effets de l'absence de l'endophiline A2 ou de la dynamine au cours de l'endocytose de l'IL-2R

Dans la condition contrôle, la dynamine et l'endophiline sont recrutées vers la fin du mécanisme conduisant à la séparation de la vésicule. Lors de la déplétion de l'endophiline, seule une partie des vésicules disparaîtront du plan TIRF. Deux explications sont possibles : il peut rester suffisamment d'endophiline pour assurer l'endocytose de quelques récepteurs ou conduit à une diminution de l'efficacité du mécanisme. Lors de l'absence de la dynamine 2 dans les cellules, l'endophiline A2 reste associée à l'IL-2R plus longtemps, suggérant que la dynamine 2 serait nécessaire pour le départ/la régulation de l'endophiline A2.

3. Conclusion et perspectives :

L'endophiline et la dynamine sont deux facteurs impliqués dans l'étape finale de l'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine correspondant à la séparation de la vésicule de la membrane plasmique. Dans la voie dépendante de la clathrine (CME), la dynamine n'a pas besoin de l'endophiline pour être recrutée aux sites d'endocytose. Dans la voie indépendante de la clathrine (IL-2R), la dynamine est recrutée en présence de l'endophiline au site d'endocytose (Figure 43) mais la durée de présence de la dynamine est moins homogène dans le temps que dans la voie CME. En revanche, dans les deux voies, le recrutement de la dynamine est nécessaire pour le départ de l'endophiline.

La dynamine et l'endophiline sont donc recrutées différemment dans la voie dépendante et indépendante de la clathrine (Figure 44).

Pour confirmer nos données, nous sommes en train de déterminer le nombre de molécules d'endophiline et de dynamine requise au cours de l'endocytose de l'IL-2R grâce à la technique du « single molecule tracking » (collaboration avec Alexandre Grassart) et décrit dans (Grassart et al., 2014). Toutes ces données devraient nous permettre de proposer un modèle et de préciser les rôles et fonctions de ces deux protéines dans ces deux voies d'endocytose.

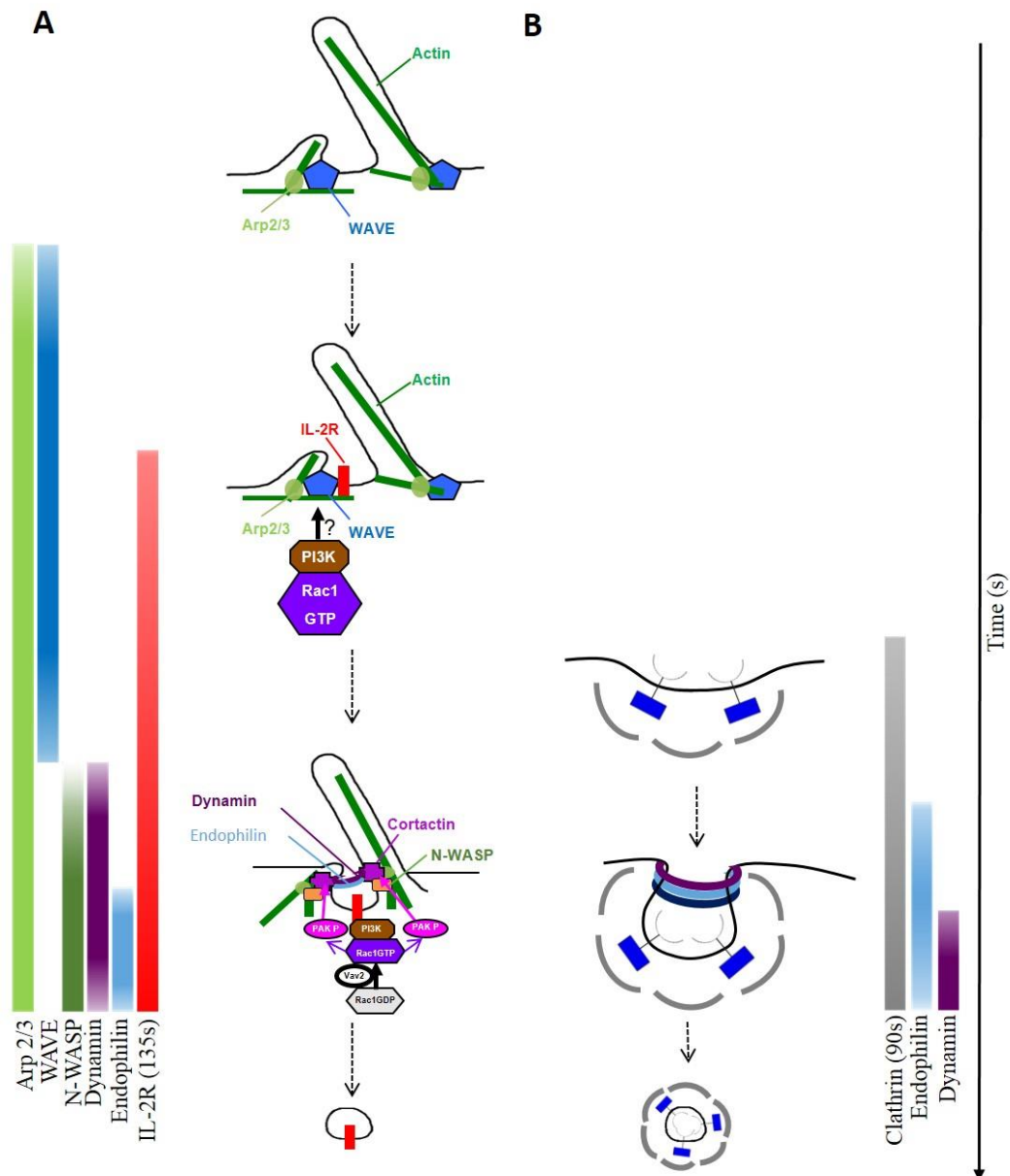


Figure 44 : Schéma récapitulatif du recrutement de l'endophiline et de la dynamine de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et celle suivie par l'IL-2R. L'endophiline A2 et la dynamine 2 sont recrutées dans le dernier tiers des deux mécanismes d'endocytose.

(A) Dans la voie d'endocytose constitutive de l'IL-2R, la formation d'une protrusion membranaire permet la production de la vésicule. L'IL-2R entre dans la cellule en 135 secondes (+/- 50 secondes). L'endophiline est recrutée au site d'endocytose pour une durée homogène de 20 à 30 secondes alors que la dynamine 2 est moins homogène (20 à 60 secondes).

(B) Dans la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, le recrutement de la dynamine est plus homogène avec un pic de 24 secondes alors que la durée d'interaction de l'endophiline avec la clathrine varie de 10 à 50 secondes.

Référence : (Basquin et al., 2015) ; (Daumke et al., 2014)

Discussion & perspectives

Certaines protéines sont impliquées à la fois dans l'endocytose dépendante de la clathrine et l'endocytose des récepteurs de cytokines ((IL-2R), (schéma 30 et 31)). La dynamine, la cortactine, l'endophiline, l'actine et N-WASP sont nécessaires aux deux voies mais leurs régulations et/ou leurs actions sont différentes dans chacune des voies. Dans la voie IL-2R, la phosphorylation de la cortactine est nécessaire au recrutement efficace de N-WASP ((Grassart et al., 2008), (Grassart et al. 2010)).

I. L'endophiline et la dynamine dans l'endocytose constitutive de l'IL-2R et dans l'endocytose dépendante de la clathrine

L'endophiline est recrutée dans la voie clathrine mais la déplétion de cette protéine par siRNA n'affecte pas l'endocytose de la transferrine, ce qui indique que l'endophiline n'est pas indispensable à ce mécanisme. En revanche, dans la voie d'endocytose constitutive indépendante de la clathrine suivie par l'IL-2R, nos résultats montrent que l'endophiline recrute la dynamine, cela pourrait expliquer pourquoi la déplétion de l'endophiline affecte fortement l'internalisation de l'IL-2R.

Des travaux antérieurs ont montré que la déplétion de l'amphiphysine ou de l'endophiline individuellement ne diminuait pas la quantité de dynamine recrutée à la membrane plasmique, seule la déplétion simultanée de ces deux protéines diminue de 75% son recrutement (Meinecke et al., 2013). La scission de vésicules à partir de GUVs en présence de dynamine, de GTP et d'endophiline ou d'amphiphysine suggère une redondance des fonctions de l'endophiline et de l'amphiphysine dans le recrutement et le contrôle de l'activité de la dynamine (Meinecke et al., 2013). L'absence d'effet de la déplétion de l'endophiline dans la voie médiée par la clathrine pourrait donc être expliquée par la présence et l'action de l'amphiphysine. Dans la voie été identifiée dans le crible siRNA (tableau 1), suggérant que ce facteur ne serait pas impliqué.

Ainsi, il n'y aurait pas de redondance d'action entre l'amphiphysine et l'endophiline dans la voie constitutive de l'IL-2R. Cela suggère que le mécanisme de scission serait différent entre les deux voies d'endocytose.

Les vésicules formées dans la voie dépendante de la clathrine ont une taille plus homogène (80 à 100 nm) que dans la voie suivie par l'IL-2R (40 à 180 nm, (Basquin et al., 2015)). Le recrutement de nombreuses protéines courbant les membranes (BAR, ENTH, ANTH) dans la voie dépendante de la clathrine (CME) et la cage formée par la clathrine pourrait réguler finement la taille des vésicules à manteau clathrine (Meinecke et al., 2013). Dans la voie d'endocytose indépendante de la clathrine, il n'y a pas de manteau pour aider à la formation de la vésicule ou du cou de la vésicule. L'endophiline pourrait jouer un rôle dans la formation du cou des vésicules, étape nécessaire à la scission.

II. Comparaison entre la voie FEME et celle suivie par l'IL-2R

La caractérisation de la voie FEME a permis d'identifier différents cargos empruntant cette voie, des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG, β 1-adrénergique), des récepteurs de type tyrosine kinase (RTK, EGFR, IGF1R) et des récepteurs de cytokines (IL-2R) (Figure 40, (Boucrot et al., 2015)).

La voie FEME est, comme la voie d'endocytose suivie par l'IL-2R, indépendante de la clathrine ((Sauvonnet, Dujeancourt, & Dautry-Varsat, 2005), (Boucrot et al., 2015)). Elles partagent des facteurs communs tels que l'endophiline, la dynamine, la cortactine, la PI3K, Pak et Rac (Boucrot et al., 2015). Les similarités entre ces deux voies ont conduit à se demander si elles pourraient être une seule et même voie qui, en fonction du cargo à internaliser, recruterait des protéines différentes, par exemple la lamellipodine pour l'EGFR.

La voie FEME est présentée comme une voie en réponse à des stimulations par un ligand (EGF, IL-2, dénopamine...) conduisant à la signalisation. Or, la voie de l'IL-2R comporte deux modes : la voie induite qui pourrait correspondre à la voie FEME et la voie constitutive qui est indépendante du ligand et qui ne conduit pas à la signalisation. Il serait intéressant de regarder si les différents cargos empruntant la voie FEME colocalisent avec l'IL-2R (même vésicule), car les vésicules contenant l'IL-2R semblent à première vue différente de celle de la voie FEME (Figure 44). Toutefois, il n'est pas possible de conclure sur ces images puisqu'elles n'ont pas été réalisées dans les mêmes conditions, ni même dans les mêmes cellules.

Nous n'avons pas pu montrer s'il y avait une interaction entre l'endophiline et l'IL-2R à cause de l'absence de reproductibilité des résultats. Cela n'exclut pas pour autant une interaction de l'endophiline avec IL-2R. L'identification du motif riche en proline «PARPPSPSPSPVPAPAPPPGPPRP», absent de la séquence de l'IL-2R β , mais présent sur certains récepteurs de type RCPG tel que le récepteur β -1 adrénergique a permis d'établir une sous-famille de récepteurs capable d'interagir directement avec l'endophiline empruntant la voie FEME ((Green & Liggett, 1994), (Tang et al., 1999), (Boucrot et al., 2015)). Il est envisageable que, comme dans la voie clathrine, les cargos recrutent différents adaptateurs en fonction des motifs présents dans leur séquence. CIN85, un adaptateur entre deux protéines identifiées (Endophilin et CBL) dans la voie d'endocytose suivie par l'IL-2R, était un bon candidat, mais il serait utile d'investiguer pour déterminer si cette interaction de l'endophiline avec l'IL-2R existe et si oui, par quel mécanisme.

Il serait aussi intéressant de tester si la lamellipodine serait impliquée dans l'endocytose induite de l'IL-2R. Si son implication était vérifiée, elle serait un acteur spécifique de la voie d'endocytose induite par l'IL-2 et pourrait participer à un recrutement plus efficace de l'endophiline permettant une endocytose plus rapide de l'IL-2R.

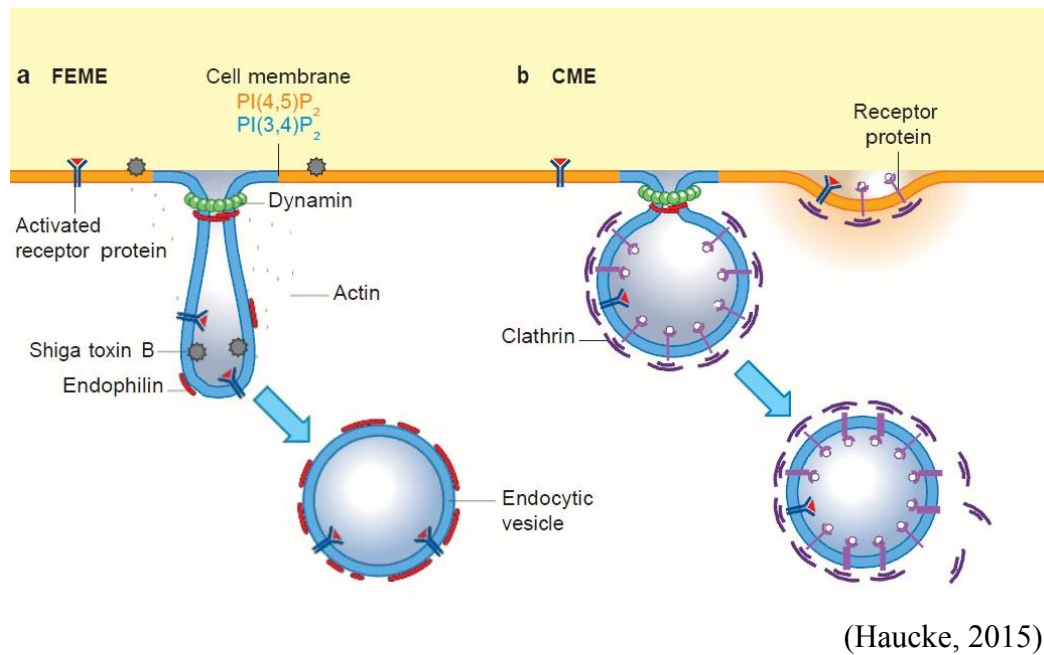


Figure 45 : Schéma comparatif entre la voie dépendante de la clathrine et la voie FEME
Schéma représentant les étapes tardives de l'endocytose dépendante de la voie clathrine (CME) en (A) et la voie FEME en (B) ((Hauke, 2015), (Boucrot et al., 2015)). Dans la voie FEME, l'endophiline recouvre la vésicule contenant la toxine de Shiga alors que dans la voie CME, c'est la clathrine. Pour finir, dans la voie FEME, l'action coopérative de la dynamine, de l'endophiline et de l'action est nécessaire pour conduire à la scission de la vésicule.

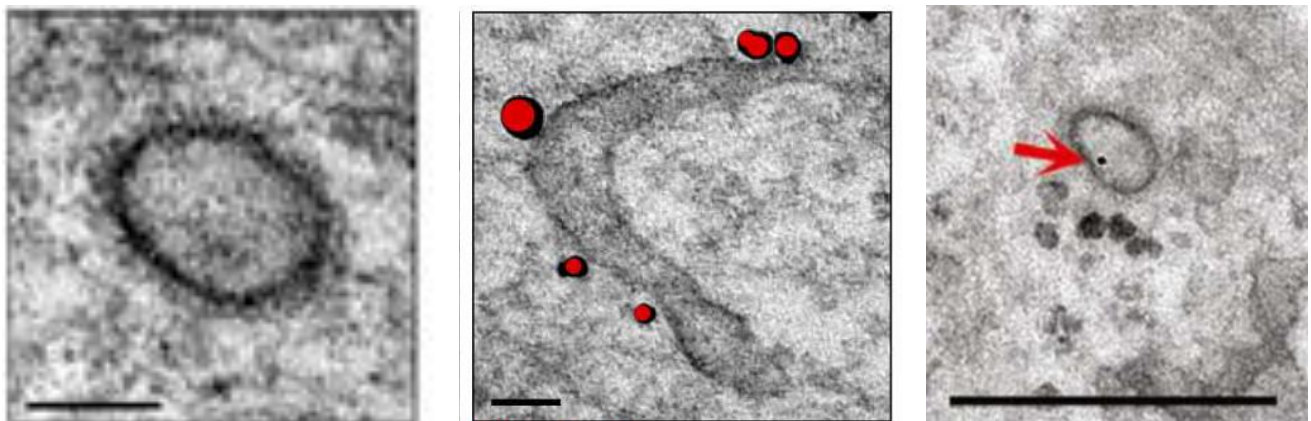


Figure 46 : Différences entre les vésicules formées dans la voie dépendante de la clathrine par rapport à la voie FEME et à l'endocytose constitutive de l'IL-2R.
Images de microscopie électronique représentant une vésicule en cours d'endocytose dans la voie dépendante de la clathrine (à gauche), la voie FEME (aspect tubulo-vésiculaire, au milieu) et la voie d'endocytose constitutive suivie par l'IL-2R (à droite) ((Boucrot et al., 2015), (Basquin et al., 2015)). Scale bar 250nm (image de gauche et du milieu) et 500nm (image de droite)

Dans la voie FEME, les données publiées présentent une action très rapide de l'endophiline qui, en quelques secondes est recrutée au niveau des synapses, alors que nous avons montré dans l'article #2 que le recrutement de l'endophiline et l'entrée de l'IL-2R ne sont pas aussi rapide. En effet, il faut en moyenne 135 secondes pour l'internalisation de l'IL-2R et l'endophiline n'est recrutée qu'en fin de mécanisme pour une durée de 20 à 40 secondes (Figure 43).

Le complexe WAVE interagit avec l'IL-2R via le motif WIRS présent dans la séquence de l'IL-2R ((B. Chen et al., 2014), (Basquin et al., 2013)). Il est possible que d'autres récepteurs possédant ce motif empruntent cette voie d'endocytose.

Les protéines courbant les membranes, telles que celles à domaine ENTH, ANTH et BAR, jouent un rôle essentiel dans différentes étapes de l'endocytose de la voie médiée par la clathrine notamment dans l'étape de la stabilisation de la structure de la vésicule. Le complexe WAVE interagit avec l'endophiline A2 et est également nécessaire dans la voie FEME (communication personnelle d'Emmanuel Boucrot). Il est donc possible que l'endophiline soit impliquée dans la stabilisation de la protrusion membranaire. Cela pourrait être testé par une étude de microscopie électronique en absence d'endophiline, comme cela a été réalisé pour la dynamine dans mon laboratoire (Basquin et al., 2015).

III. Le rôle potentiel des protéines confirmées au cours de cette étude

i. Les endophilines

Les endophilines A1, A2, A3, B1 et B2 ne sont pas présentes dans tous les types cellulaires. L'isoforme A1 est essentiellement exprimée dans les neurones alors qu'A2 est ubiquitaire. Certaines isoformes ne sont localisées que dans le noyau et le cytosol (endophiline B1, B2).

Peu d'études ont été réalisées sur l'endophiline B1. Elle est impliquée dans la structure morphologique des mitochondries et jouerait un rôle dans l'autophagie ((Karbowski et al., 2004), (Takahashi et al., 2009)). Elle est présente dans le cytoplasme et est en association avec

des structures de type vésiculaire ((Li et al., 2016)). L'endophiline B1 est également nécessaire dans le trafic intracellulaire de l'EGFR (C. Zhang, Li, Zhang, & Xiao, 2011).

Quant à l'endophiline B2, son rôle dans les cellules a été très peu étudié. Elle est présente essentiellement dans le noyau (Vannier et al., 2013). Elle peut agir sur le cytosquelette et participer à l'endocytose du récepteur au glutamate (Loebrich et al., 2016). Elle joue également un rôle dans la mitophagie avec l'endophiline B1 (Y.-H. Wang et al., 2016). Lorsque j'ai voulu étudier le rôle de l'endophiline B2 dans l'endocytose de l'IL-2R, j'ai constaté que la transfection transitoire de la construction codante pour l'endophiline B2 (Don de Emmanuel Boucrot) était cytosolique et ne donnait pas de signal à la membrane plasmique en plan TIRF (Données non publié). Aussi, l'un des rôles possible de l'endophiline B2 serait dans le trafic intracellulaire de l'IL-2R.

ii. Rôle de la phosphorylation de l'endophiline A1 et A2 dans l'endocytose de l'IL-2R ?

Les endophilines sont des protéines phosphorylables. Chaque isoforme possède son propre site de phosphorylation (T-14 pour EndoA1 et Y-315 pour EndoA2), permettant la régulation de son activité ou de son association avec d'autres molécules ainsi qu'un site de phosphorylation commun (S-75) (Matta et al., 2012). La phosphorylation du résidu T-14 serait nécessaire à l'interaction de l'endophiline A1 avec CIN85 (Kaneko et al., 2005). La phosphorylation du résidu Y-315 de l'endophiline A2 inhiberait l'entrée de « Membrane type 1 metalloprotease » MT1-MMP, une protéine qui dégrade la matrice extracellulaire ((Wu et al., 2005), (Fan et al., 2013)).

Une étude récente (Ambroso et al., 2014) montre que le site de phosphorylation S75 localisé dans l'hélice amphipatique de l'endophiline A1 conduit à un changement de conformation qui modifie le degré d'insertion de cette dernière avec la membrane (Figure 47).

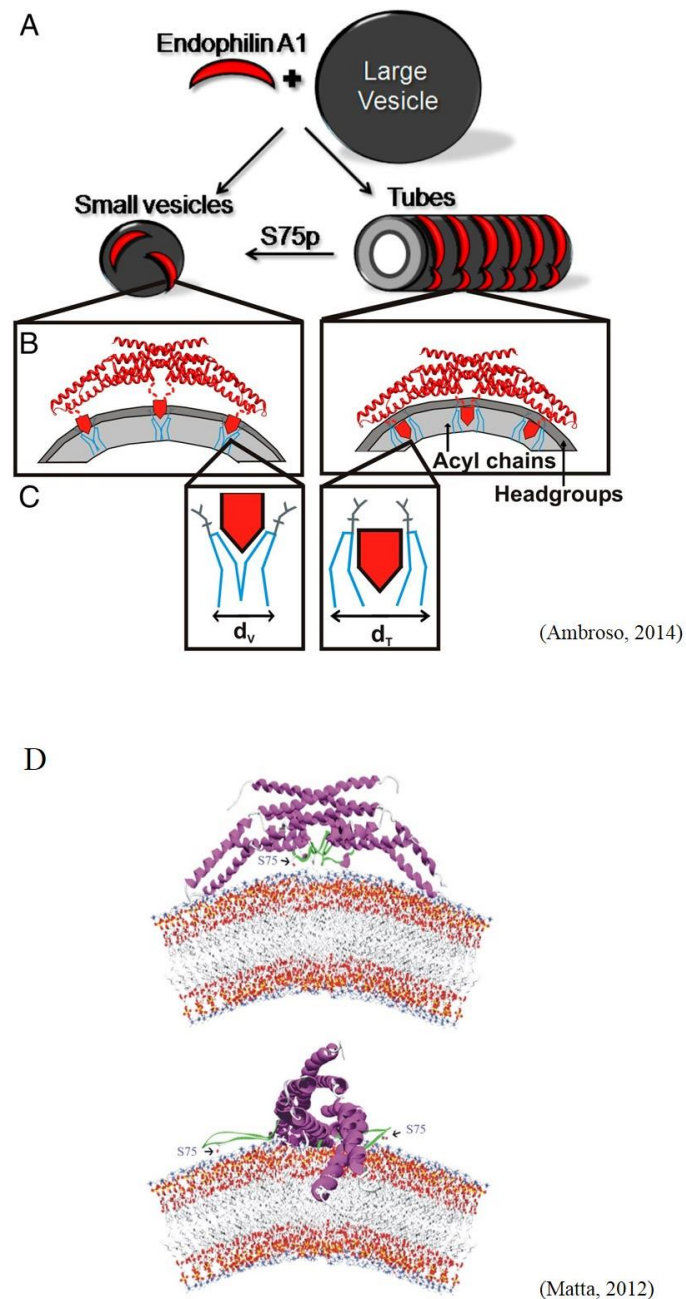


Figure 47 : Rôles putatifs de la phosphorylation/déphosphorylation des endophilines dans les voies d'endocytose

- (A) L'incubation de l'endophiline en présence de liposomes peut produire des tubulations mais aussi des vésicules.
- (B) L'endophiline peut utiliser soit le domaine BAR, soit l'hélice qui s'insère dans la bicouche lipidique pour se lier aux membranes.
- (C) Conséquence de la phosphorylation/desphosphorylation de l'endophiline sur la production de tubes ou de petites vésicules sur des GUVs. La phosphorylation de l'endophiline destabilise les tubes au profit de la formation des vésicules.
- (D) Twist de l'endophiline dans la bicouche lipidique par phosphorylation/desphosphorylation de la sérine en position 75

Référence : (Matta et al., 2012), (Kaneko et al., 2005), (Wu et al., 2005), (Fan et al., 2013), (Ambroso et al., 2014), (Poudel et al., 2016)

Il est donc possible que la phosphorylation de S-75 sur l'endophiline A2 ait le même effet. La liaison, l'insertion des hélices et la déformation des membranes sont des étapes successives (Poudel et al., 2016). Ces étapes pourraient être contrôlées par un changement de conformation comme cela est le cas pour la dynamine. Le résidu S-75 est commun aux deux isoformes identifiées dans l'endocytose suivie par l'IL-2R. Il est donc envisageable que la phosphorylation des endophilines joue un rôle dans la scission de la vésicule en changeant leur conformation, en permettant le recrutement, ou une meilleure efficacité de fonction, de la dynamine.

L'endophiline A2 pourrait aussi conduire à la formation d'un cou de vésicule qui serait ensuite séparée de la membrane par l'action conjointe de la dynamine avec l'actine, deux protéines capables d'interagir avec les endophilines.

iii. La phospholipase D1

La phospholipase D1 est une enzyme qui hydrolyse le phosphatidylcholine en acide phosphatidique (PA) et en choline. L'accumulation locale du produit PA pourrait induire une déformation de la membrane et jouer un rôle dans l'endocytose (Figure 12). Nos résultats montrent que la phospholipase D (PLD) et son activité catalytique sont nécessaires à l'endocytose de l'IL-2R. Ceci suggère que l'acide phosphatidique, le produit de PLD, pourrait initier la déformation de la membrane et faciliter l'action du complexe WAVE grâce aux protrusions que l'accumulation du PA peut produire. Le complexe WAVE et PA pourrait fonctionner en synergie pour former les protrusions. Il pourrait intervenir au moment de l'étape de la constriction du cou de la vésicule et permettre à la dynamine d'être plus efficace.

iv. L'ubiquitine ligase CBL

L'implication de CBL, une ubiquitine ligase, dans l'endocytose de l'IL-2R est particulièrement intéressante puisque cette protéine est également impliquée dans la signalisation des récepteurs de cytokines. Elle est recrutée en présence d'IL-2 et le récepteur est triée après ubiquitination vers les lysosomes pour être dégradée ((Gesbert et al., 2005), (Rocca et al., 2001)). Tout comme la PI3K, qui joue un rôle pivot entre l'endocytose et la signalisation, CBL pourrait aussi être importante dans l'endocytose induite par l'IL-2, pouvant aussi accélérer l'endocytose du récepteur. CBL est aussi impliquée dans l'endocytose du récepteur des lymphocytes B (BCR, voie d'endocytose dépendante de la clathrine) (Jacob et al., 2008). Elle y a deux rôles, le premier dans la signalisation, le second dans l'entrée du récepteur en l'ubiquitinylant et en permettant le recrutement de Rac1 (Jacob et al., 2008).

De plus, CBL est capable, sous stimulation de la cytokine « Erythropoïétine » EPO (utilisant la voie dépendante de la clathrine), d'interagir avec la sous-unité p85 de la PI3K (Bulut, Sulahian, Yao, & Huang, 2013) permettant l'interaction avec l'epsine 1 qui conduit à l'endocytose du récepteur de l'EPO. Ce mécanisme pourrait également être commun à celui de l'IL-2R. Cependant, il ne conduirait pas au recrutement de l'epsine puisque cette dernière n'est pas impliquée dans l'endocytose de l'IL-2R (Tableau 3). D'autres protéines courbant les membranes telles que les endophilines pourrait être recrutées, directement ou indirectement.

v. L'arrestine bêta 1

Les bêta arrestines 1 et 2 font partie de la famille des bêta-arrestines qui sont requises pour la désensibilisation des récepteurs de type RCPG ((Krasel, Bunemann, Lorenz, & Lohse, 2005); (« β 2-adrenergic receptor »)) La question de l'implication de l'arrestine bêta 1 dans la voie FEME a été adressée par siRNA et a montré que l'absence de l'arrestine bêta 1 n'empêchait pas l'endocytose de l'adrénergique récepteur β 1 entrant par la voie FEME.

L'arrestine bêta 1 est une protéine dont le rôle dans l'ubiquitination du récepteur de l'« insulin-like Growth Factor » (IGF1R) a été mise en évidence par une étude *in vitro* (Girnita, 2005, (Jean-Charles et al., 2016)). Cette protéine servirait donc d'adaptateur aux ligases de type E3, CBL faisant partie de cette famille (Zheng, 2000).

Pour tester si la bêta arrestine joue un rôle dans l'ubiquitination de l'IL-2R, il serait possible de faire un siRNA dirigé contre l'arrestine sur les cellules Kit225 (avec et sans ajout de l'IL-2) et observer si le récepteur de l'IL-2 est toujours ubiquitinylé. Dans les cellules contrôles, il devrait être possible de voir s'il y a une interaction avec CBL.

Nom de la protéine	Activité enzymatique et localisation cellulaire	Rôle potentiel dans la voie IL-2R	Implication dans la voie CME	Implication dans la voie constitutive de l'IL-2R	Implication dans la voie FEME (« canonique »)
β-arrestine 1	Membrane plasmique et cytoplasme	Ubiquitination de l'IL-2R	Implication pour quelques cargos (RGPG)	OUI	NON
CBL	Ubiquitine ligase E3 Membrane plasmique et cytoplasme	Ubiquitination de l'IL-2R	Implication pour l'EGFR	OUI	Non déterminé
CIN85			Implication pour l'EGFR	NON	Non déterminé
PLD1	Hydrolyse du phosphatidylcholine en acide phosphatidique (PA) et en choline Membrane plasmique et cytoplasme	Accumulation de PA locale (déformation membranaire) Insertion de la dynamine dans la bicouche lipidique	NON	OUI	Non déterminé
Endophiline A1 et A2	Membrane plasmique et cytoplasme	Induction, stabilisation, détection des courbures membranaires	Présente mais pas indispensable	OUI	OUI
Endophiline B1 et B2	cytoplasme	Action dans le trafic intracellulaire	Non déterminé	OUI	Non déterminé
Lamellipodine				NON	OUI

Tableau 4 : Tableau récapitulatif sur les protéines impliquées dans cette étude dans les voies d'endocytose (CME, constitutive de l'IL-2R, FEME)

Cette étude a permis l'identification de nouveaux facteurs dans la voie d'endocytose constitutive de l'IL-2R, toutefois, leur rôle et leur implication dans la voie induite de l'IL-2R reste à découvrir. Il serait intéressant de tester quelques récepteurs possédant le motif WIRS pour voir s'ils empruntent la même voie l'endocytose que l'IL-2R ou la voie FEME. Plus généralement, l'importance d'avoir un modèle d'étude dans lequel cohabiteraient les deux voies d'endocytose (constitutive et induite) permet une meilleure compréhension de ces deux voies. Un travail d'orchestration sur ce type de cellule pourrait expliquer ce qui permet à l'endocytose induite d'être deux fois plus rapide que l'endocytose constitutive. L'activation par le ligand pourrait conduire à un recrutement plus efficace ou à des protéines non identifiées à ce jour qui faciliterait l'endocytose induite. L'émergence de la technologie de l'édition du génome des cellules et de nouveaux outils de transfection (Néon, Amaxa, lipofectant) devrait nous conduire à développer un modèle plus physiologique et réaliser une étude comparative entre l'endocytose de l'IL-2R constitutive et induite.

Les travaux réalisés ces dernières années ont permis d'identifier une nouvelle voie nommée FEME qui est utilisée par de nombreux cargos. L'endophiline, est une protéine à domaine BAR courbant les membranes, qui est essentielle à ce mécanisme d'endocytose indépendante de la clathrine. L'émergence de toutes ces voies d'endocytose qui peuvent être ubiquitaire ou présents que dans certains tissus mène à une réflexion sur l'importance de ces mécanismes. Les vésicules formées peuvent être ou non recouvertes d'un manteau et plusieurs cargos peuvent emprunter une même voie par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice en fonction du motif présent dans la séquence du cargo à internaliser. Quel est l'intérêt pour les cellules d'avoir un tel niveau de complexité ? Cela pourrait-il provenir d'adaptation au cours du temps ou de symbiose avec des pathogènes ?

Références bibliographiques

- Aguet, F., Antonescu, C. N., Mettlen, M., Schmid, S. L., & Danuser, G. (2013). Advances in Analysis of Low Signal-to-Noise Images Link Dynamin and AP2 to the Functions of an Endocytic Checkpoint. *Developmental Cell*, 26(3), 279–291. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.019>
- Ambroggio, E. E., Sillibourne, J., Antonny, B., Manneville, J.-B., & Goud, B. (2013). Arf1 and Membrane Curvature Cooperate to Recruit Arfaptin2 to Liposomes. *Plos One*, 8(4), e62963. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062963.g003>
- Ambroso, M. R., Hegde, B. G., & Langen, R. (2014). Endophilin A1 induces different membrane shapes using a conformational switch that is regulated by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://doi.org/10.1073/pnas.1402233111>
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., & Chabre, M. (1997). N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange. *Biochemistry*, 36(15), 4675–4684. <http://doi.org/10.1021/bi962252b>
- Antonny, B., Burd, C., De Camilli, P., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., et al. (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *The EMBO Journal*, e201694613. <http://doi.org/10.15252/embj.201694613>
- Ariotti, N., Rae, J., Leneva, N., Ferguson, C., Loo, D., Okano, S., et al. (2015). Molecular Characterization of Caveolin-induced Membrane Curvature. *Journal of Biological Chemistry*, 290(41), 24875–24890. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.644336>
- Arkhipov, A., Yin, Y., & Schulten, K. (2009). Membrane-Bending Mechanism of Amphiphysin N-BAR Domains. *Biophysical journal*, 97(10), 2727–2735. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.051>
- Basquin, C., & Sauvonnnet, N. (2013). Phosphoinositide 3-kinase at the crossroad between endocytosis and signaling of cytokine receptors. *Communicative & Integrative Biology*, 6(4), e24243–1108. <http://doi.org/10.4161/cib.24243>
- Basquin, C., Malardé, V., Mellor, P., Anderson, D. H., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J.-C., et al. (2013). The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 5), 1099–1108. <http://doi.org/10.1242/jcs.110932>
- Basquin, C., Trichet, M., Vihinen, H., Malardé, V., Lagache, T., Ripoll, L., et al. (2015). Membrane protrusion powers clathrin-independent endocytosis of interleukin-2 receptor. *Embo Journal*, 34(16), 2147–2161. <http://doi.org/10.15252/embj.201490788>
- Bastiani, M., & Parton, R. G. (2010). Caveolae at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(22), 3831–3836. <http://doi.org/10.1242/jcs.070102>
- Bigay, J., Casella, J.-F., Drin, G., Mesmin, B., & Antonny, B. (2005). ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *The EMBO Journal*, 24(13), 2244–2253. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600714>
- Bohdanowicz, M., Schlam, D., Hermansson, M., Rizzuti, D., Fairn, G. D., Ueyama, T., et al. (2013). Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes. *Molecular Biology of the Cell*, 24 (11) 1700-1712 -. <http://doi.org/10.1091/mbc.E12-11-0789>
- Boucrot, E., Ferreira, A. P. A., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., et al. (2015). Endophilin marks and controls a clathrin- independent endocytic pathway. *Nature*, 517(7535), 460–465. <http://doi.org/10.1038/nature14067>
- Boucrot, E., Pick, A., Camdere, G., Liska, N., Evergren, E., McMahon, H. T., & Kozlov, M.

- M. (2012). Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell*, 149(1), 124–136.
- Bulut, G. B., Sulahian, R., Yao, H., & Huang, L. J.-S. (2013). Cbl ubiquitination of p85 is essential for Epo-induced EpoR endocytosis. *Blood*, 122(24), 3964–3972. <http://doi.org/10.1182/blood-2013-05-506212>
- Burger, K. N. J., Demel, R. A., Schmid, S. L., & de Kruijff, B. (2000). Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry*, 39(40), 12485–12493. <http://doi.org/10.1021/bi000971r>
- Busch, D. J., Houser, J. R., Hayden, C. C., Sherman, M. B., Lafer, E. M., & Stachowiak, J. C. (2015). Intrinsically disordered proteins drive membrane curvature. *Nature Communications*, 6, 7875. <http://doi.org/10.1038/ncomms8875>
- Campellone, K. G., & Welch, M. D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(4), 237–251. <http://doi.org/10.1038/nrm2867>
- Cao, H., Garcia, F., & McNiven, M. A. (1998). Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell*, 9(9), 2595–2609.
- Cao, H., Orth, J. D., Chen, J., Weller, S. G., Heuser, J. E., & McNiven, M. A. (2003). Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Molecular And Cellular Biology*, 23(6), 2162–2170. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12612086&retmode=ref&cmd=prlinks>
- Capraro, B. R., 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*, 132(4), 1200–1201. <http://doi.org/10.1021/ja907936c>
- Carlsson, A. E. (2010). Actin Dynamics: From Nanoscale to Microscale. *Annual Review of Biophysics*, 39(1), 91–110. <http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131207>
- Chang-Ileto, B., Frere, S. G., Chan, R. B., Voronov, S. V., Roux, A., & Di Paolo, G. (2011). Synaptojanin 1-mediated PI(4,5)P₂ hydrolysis is modulated by membrane curvature and facilitates membrane fission. *Developmental Cell*, 20(2), 206–218. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.008>
- Chappie, J. S., & Dyda, F. (2013). Building a fission machine - structural insights into dynamin assembly and activation. *Journal of Cell Science*, 126(13), 2773–2784. <http://doi.org/10.1242/jcs.108845>
- Chappie, J. S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S. L., & Dyda, F. (2010). G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature*, 465(7297), 435–440. <http://doi.org/10.1038/nature09032>
- Chazal, N., & Gerlier, D. (2003). Virus Entry, Assembly, Budding, and Membrane Rafts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2), 226–237. <http://doi.org/10.1128/MMBR.67.2.226-237.2003>
- Chen, B., Brinkmann, K., Chen, Z., Pak, C. W., Liao, Y., Shi, S., et al. (2014). The WAVE Regulatory Complex Links Diverse Receptors to the Actin Cytoskeleton. *Cell*, 156(1-2), 195–207. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.048>
- Chen, C. Y., Reese, M. L., Hwang, P. K., Ota, N., Agard, D., & Brodsky, F. M. (2002). Clathrin light and heavy chain interface: alpha-helix binding superhelix loops via critical tryptophans. *Embo Journal*, 21(22), 6072–6082.
- Chen, H., Fre, S., Slepnev, V. I., Capua, M. R., Takei, K., Butler, M. H., et al. (1998). Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature*, 394(6695), 793–797. <http://doi.org/10.1038/29555>
- Colley, W. C., Sung, T.-C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S. M., Altshuller, Y., et al. (1997). Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that

- provokes cytoskeletal reorganization. *Current Biology*, 16(3), 191–201.
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37–44. <http://doi.org/10.1038/nature01451>
- Danielli, J. F., Davson, H. (1935). A contribution to the theory of permeability of thin films - Danielli - 1935 - *Journal of Cellular Physiology*, 495-508
- Daumke, O., Lundmark, R., Vallis, Y., Martens, S., Butler, P. J. G., & McMahon, H. T. (2007). Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. *Nature*, 449(7164), 923–927. <http://doi.org/10.1038/nature06173>
- Daumke, O., Roux, A., & Haucke, V. (2014). BAR Domain Scaffolds in Dynamin-Mediated Membrane Fission. *Cell*, 156(5), 882–892. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.017>
- De Camilli, P., Chen, H., Hyman, J., Panepucci, E., Bateman, A., & Brunger, A. T. (2002). The ENTH domain. *FEBS Letters*, 513(1), 11–18.
- Devaux, P. F., Herrmann, A., Ohlwein, N., & Kozlov, M. M. (2008). How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(7-8), 1591–1600. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.03.007>
- Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K., & Gratton, E. (2001). Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophysical journal*, 80(3), 1417–1428.
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 857–902. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Dominguez, R. (2009). Actin filament nucleation and elongation factors – structure–function relationships. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(6), 351–366. <http://doi.org/10.3109/10409230903277340>
- Drin, G., Casella, J.-F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T. U., & Antonny, B. (2007). A general amphipathic α -helical motif for sensing membrane curvature. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(2), 138–146. <http://doi.org/10.1038/nsmb1194>
- Duden, R., Griffiths, G., Frank, R., Argos, P., & Kreis, T. E. (1991). Beta-Cop, a 110 Kd Protein Associated with Non-Clathrin-Coated Vesicles and the Golgi-Complex, Shows Homology to Beta-Adaptin. *Cell*, 64(3), 649–665.
- Duprez, V., Lenoir, G., & Dautry-Varsat, A. (1985). Autocrine growth stimulation of a human T-cell lymphoma line by interleukin 2. *Pnas*, 82(20), 6932–6936.
- Duprez, V., Ferrer, M., Cornet, V., Olive, D., & Dautry-Varsat, A. (1991). Modulation of interleukin 2 internalization and interleukin 2-dependent cell growth by antireceptor antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(3), 1497–1501.
- Duprez, V., Smoljanovic, M., Lieb, M., & Dautry-Varsat, A. (1994). Trafficking of Interleukin-2 and Transferrin in Endosomal Fractions of T-Lymphocytes. *Journal of Cell Science*, 107, 1289–1295.
- Elvington, S. M., & Nichols, J. W. (2007). Spontaneous, intervesicular transfer rates of fluorescent, acyl chain-labeled phosphatidylcholine analogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(3), 502–508. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.013>
- Faelber, K., Posor, Y., Gao, S., Held, M., Roske, Y., Schulze, D., et al. (2011). Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature*, 477(7366), 556–560. <http://doi.org/10.1038/nature10369>
- Fan, H., Zhao, X., Sun, S., Luo, M., & Guan, J.-L. (2013). Function of Focal Adhesion Kinase Scaffolding to Mediate Endophilin A2 Phosphorylation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Mammary Cancer Stem Cell Activities in Vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3322–3333. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.420497>
- Faraulo, J., & Travesset, A. (2007). Phosphatidic Acid Domains in Membranes: Effect of Divalent Counterions. *Biophysical Journal*, 92(8), 2806–2818.

- <http://doi.org/10.1529/biophysj.106.092015>
- Farge, E. E., Ojcius, D. M. D., Subtil, A. A., & Dautry-Varsat, A. A. (1999). Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. *American Journal of Physiology -- Legacy Content*, 276(3 Pt 1), C725–C733.
- Fath, S., Mancias, J. D., Bi, X., & Goldberg, J. (2007). Structure and Organization of Coat Proteins in the COPII Cage. *Cell*, 129(7), 1325–1336. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.036>
- Ferguson, S., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., et al. (2009). Coordinated Actions of Actin and BAR Proteins Upstream of Dynamin at Endocytic Clathrin-Coated Pits. *Developmental Cell*, 17(6), 811–822. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.005>
- Ford, M. G. J. (2001). Simultaneous Binding of PtdIns(4,5)P₂ and Clathrin by AP180 in the Nucleation of Clathrin Lattices on Membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5506), 1051–1055. <http://doi.org/10.1126/science.291.5506.1051>
- Ford, M. G. J., Jenni, S., & Nunnari, J. (2011). The crystal structure of dynamin. *Nature*, 477(7366), 561–566. <http://doi.org/10.1038/nature10441>
- Ford, M. G. J., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J. K., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419(6905), 361–366. <http://doi.org/10.1038/nature01020>
- Frost, A., Unger, V. M., & De Camilli, P. (2009). The BAR Domain Superfamily: Membrane-Molding Macromolecules. *Cell*, 137(2), 191–196. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.010>
- Gaffen, S. L. (2001). Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*, 14(2), 63–77. <http://doi.org/10.1006/cyto.2001.0862>
- Gallop, J. L., Jao, C. C., Kent, H. M., Butler, P. J. G., Evans, P. R., Langen, R., & McMahon, H. T. (2006). Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *The EMBO Journal*, 25(12), 2898–2910. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601174>
- Gallop, J. L., Butler, P. J. G., & McMahon, H. T. (2005). Endophilin and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission. *Nature Cell Biology*, 438(7068), 675–678. <http://doi.org/10.1038/nature04136>
- Gesbert, F., Sauvonnnet, N., & Dautry-Varsat, A. (2004). Clathrin-Independent endocytosis and signalling of interleukin 2 receptors IL-2R endocytosis and signalling. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 286, 119–148.
- Gesbert, F., Malardé, V., & Dautry-Varsat, A. (2005). Ubiquitination of the common cytokine receptor γ c and regulation of expression by an ubiquitination/deubiquitination machinery. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(2), 474–480. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.121>
- Girnita, L. (2005). β -Arrestin Is Crucial for Ubiquitination and Down-regulation of the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor by Acting as Adaptor for the MDM2 E3 Ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24412–24419. <http://doi.org/10.1074/jbc.M501129200>
- Goñi, F. M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model, *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Biomembranes*, 1838(6), 1467–1476. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.006>
- Gortat, A., San-Roman, M. J., Vannier, C., & Schmidt, A. A. (2012). Single Point Mutation in Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) Sequence of Endophilin Impairs Dimerization, Membrane Shaping, and Src Homology 3 Domain-mediated Partnership. *Journal of Biological Chemistry*, 287(6), 4232–4247. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.325837>
- Grassart, A., Dujeancourt, A., Lazarow, P. B., Dautry-Varsat, A., & Sauvonnnet, N. (2008). Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO Reports*, 9(4), 356–362. <http://doi.org/10.1038/embo.2008.28>

- Grassart, A., Meas-Yedid, V., Dufour, A., Olivo-Marin, J.-C., Dautry-Varsat, A., & Sauvonnnet, N. (2010). Pak1 phosphorylation enhances cortactin-N-WASP interaction in clathrin-caveolin-independent endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(8), 1079–1091. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01075.x>
- Grassart, A., Cheng, A. T., Hong, S. H., Zhang, F., Zenzer, N., Feng, Y., et al. (2014). Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of Cell Biology*. <http://doi.org/10.1083/jcb.201403041>
- Green, S. A., & Liggett, S. B. (1994). A proline-rich region of the third intracellular loop imparts phenotypic beta 1-versus beta 2-adrenergic receptor coupling and sequestration. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 26215–26219.
- Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., et al. (2010). Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *The EMBO Journal*, 29(21), 3593–3606. <http://doi.org/10.1038/emboj.2010.249>
- Hansen, C. G., Howard, G., & Nichols, B. J. (2011). Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *Journal of Cell Science*, 124(16), 2777–2785. <http://doi.org/10.1242/jcs.084319>
- Harrison, S. C., & Kirchhausen, T. (2010). STRUCTURAL BIOLOGY Conservation in vesicle coats. *Nature*, 466(7310), 1048–1049. <http://doi.org/10.1038/4661048a>
- Haslam, R. J., Koide, H. B., & Hemmings, B. A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature*, 363(6427), 309–310. <http://doi.org/10.1038/363309b0>
- Haucke, V. (2015). Cell biology: On the endocytosis rollercoaster. *Nature*, 517(7535), 446–447. <http://doi.org/10.1038/nature14081>
- Henley, J. R., Krueger, E. W. A., Oswald, B. J., & McNiven, M. A. (1998). Dynamin-mediated Internalization of Caveolae. *The Journal of Cell Biology*, 141(1), 85–99. <http://doi.org/10.1083/jcb.141.1.85>
- Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., & McMahon, H. T. (2010). FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5983), 1281–1284. <http://doi.org/10.1126/science.1188462>
- Henne, W. M., Kent, H. M., Ford, M. G. J., Hegde, B. G., Daumke, O., Butler, P. J. G., et al. (2007). Structure and Analysis of FCHo2 F-BAR Domain: A Dimerizing and Membrane Recruitment Module that Effects Membrane Curvature. *Structure (London, England : 1993)*, 15(7), 839–852. <http://doi.org/10.1016/j.str.2007.05.002>
- Hershko, A., & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 425–479. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Hémar, A., Lieb, M., Subtil, A., DiSanto, J. P., & 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*, 24(9), 1951–1955. <http://doi.org/10.1002/eji.1830240902>
- Hémar, A., Subtil, A., Lieb, M., Morelon, E., Hellio, R., & Dautry-Varsat, A. (1995). Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains. *The Journal of Cell Biology*, 129(1), 55–64. <http://doi.org/10.1083/jcb.129.1.55>
- Holkar, S. S., Kamerkar, S. C., & Pucadyil, T. J. (2015). Spatial Control of Epsin-induced Clathrin Assembly by Membrane Curvature. *Journal of Biological Chemistry*, 290(23), 14267–14276. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.653394>
- Hom, R. A., Vora, M., Regner, M., Subach, O. M., Cho, W., Verkhusha, V. V., et al. (2007). pH-dependent Binding of the Epsin ENTH Domain and the AP180 ANTH Domain to PI(4,5)P2-containing Bilayers. *Journal of Molecular Biology*, 373(2), 412–423. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.016>
- Hong, S. H., Cortesio, C. L., & Drubin, D. G. (2015). Machine-Learning-Based Analysis in

- Genome-Edited Cells Reveals the Efficiency of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Cell Reports*, 12(12), 2121–2130. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.048>
- Horvath, C. A. J., Vanden Broeck, D., Boulet, G. A. V., Bogers, J., & De Wolf, M. J. S. (2007). Epsin: Inducing membrane curvature. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(10), 1765–1770. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.12.004>
- Huttner, W. B., & Schmidt, A. (2000). Lipids, lipid modification and lipid–protein interaction in membrane budding and fission — insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Current Opinion in Neurobiology*.
- Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., & Pietro P De Camilli. (2005). Dynamin and the Actin Cytoskeleton Cooperatively Regulate Plasma Membrane Invagination by BAR and F-BAR Proteins. *Developmental Cell*, 9(6), 791–804. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.11.005>
- Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., & Takenawa, T. (2001). Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5506), 1047–1051. <http://doi.org/10.1126/science.291.5506.1047>
- Jacob, M., Todd, L., Sampson, M. F., & Pure, E. (2008). Dual role of Cbl links critical events in BCR endocytosis. *International Immunology*, 20(4), 485–497.
- Jean-Charles, P. Y., Freedman, N. J., & Shenoy, S. K. (2016). Cellular Roles of Beta-Arrestins as Substrates and Adaptors of Ubiquitination and Deubiquitination. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 141, pp. 339–369). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.04.003>
- Jenkins, G. M., & Frohman, M. A. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(19-20), 2305–2316. <http://doi.org/10.1007/s00018-005-5195-z>
- Jensen, D., & Schekman, R. (2011). COPII-mediated vesicle formation at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(1), 1–4. <http://doi.org/10.1242/jcs.069773>
- Kanaseki, T., & Kadota, K. (1969). The “Vesicle in a basket”: A Morphological Study of the Coated Vesicle Isolated from the Nerve Endings of the Guinea Pig Brain, with Special Reference to the Mechanism of Membrane Movements. *The journal of cell biology*, vol.42, 202-220
- Kaneko, T., Maeda, A., Takefuji, M., Aoyama, H., Nakayama, M., Kawabata, S., et al. (2005). Rho mediates endocytosis of epidermal growth factor receptor through phosphorylation of endophilin A1 by Rho-kinase - Kaneko - 2005 - Genes to Cells - Wiley Online Library. *Genes to Cells*, 10(10), 973–987. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00895.x>
- Karbowski, M., Jeong, S. Y., & Youle, R. J. (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *The Journal of Cell Biology*, 166(7), 1027–1039. <http://doi.org/10.1083/jcb.200407046>
- Kassas, N., Tryoen-Tóth, P., Corrotte, M., Thahouly, T., Bader, M.-F., Grant, N. J., & Vitale, N. (2012). Genetically encoded probes for phosphatidic acid. *Methods in Cell Biology*, 108, 445–459. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386487-1.00020-1>
- Kay, B. K., Yamabhai, M., Wendland, B., & Emr, S. D. (1999). Identification of a novel domain shared by putative components of the endocytic and cytoskeletal machinery. *Protein Science*, 8(2), 435–438. <http://doi.org/10.1110/ps.8.2.435>
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kim, H. M., Choo, H.-J., Jung, S.-Y., Ko, Y.-G., Park, W.-H., Jeon, S.-J., et al. (2007). A Two-Photon Fluorescent Probe for Lipid Raft Imaging: C-Laurdan. *ChemBioChem*, 8(5), 553–559. <http://doi.org/10.1002/cbic.200700003>

- Kim, J. H., Han, J. M., Lee, S., Kim, Y., Lee, T. G., Park, J. B., et al. (1999). Phospholipase D1 in Caveolae: Regulation by Protein Kinase $\text{C}\alpha$ and Caveolin-1 $\dagger$. *Biochemistry*, 38(12), 3763–3769. <http://doi.org/10.1021/bi982478>
- Kirchhausen, T. (2000). Three ways to make a vesicle. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(3), 187–198.
- Kirkham, M., Fujita, A., Chadda, R., Nixon, S. J., Kurzchalia, T. V., Sharma, D. K., et al. (2005). Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *The Journal of Cell Biology*, 168(3), 465–476.
- Kooijman, E. E., Chupin, V., de Kruijff, B., & Burger, K. N. J. (2003). Modulation of Membrane Curvature by Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4(3), 162–174. <http://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00086.x>
- Kooijman, E. E., Chupin, V., Fuller, N. L., Kozlov, M. M., de Kruijff, B., Burger, K. N. J., & Rand, P. R. (2005). Spontaneous Curvature of Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid $\dagger$. *Biochemistry*, 44(6), 2097–2102. <http://doi.org/10.1021/bi0478502>
- Kornberg, R. D., & McConnell, H. M. (1971). Lateral Diffusion of Phospholipids in a Vesicle Membrane. *Pnas*, 68(10), 2564–2568.
- Krabben, L., Fassio, A., Bhatia, V. K., Pechstein, A., Onofri, F., Fadda, M., et al. (2011). Synapsin I Senses Membrane Curvature by an Amphipathic Lipid Packing Sensor Motif. *Journal of Neuroscience*, 31(49), 18149–18154. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4345-11.2011>
- Krasel, C., Bunemann, M. B., Lorenz, K., & Lohse, M. J. (2005). beta-arrestin binding to the beta(2)-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9528–9535. <http://doi.org/10.1074/jbc.M413078200>
- Krause, M., & Gautreau, A. (2014). Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(9), 577–590. <http://doi.org/10.1038/nrm3861>
- Kumari, S., & Mayor, S. (2007). ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. *Nature Cell Biology*, 10(1), 30–41. <http://doi.org/10.1038/ncb1666>
- Lai, C.-L., Jao, C. C., Lyman, E., Gallop, J. L., Peter, B. J., McMahon, H. T., et al. (2012). Membrane Binding and Self-Association of the Epsin N-Terminal Homology Domain. *Journal of Molecular Biology*, 423(5), 800–817. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.010>
- Lakshminarayan, R., Wunder, C., Becken, U., Howes, M. T., Benzing, C., Arumugam, S., et al. (2014). Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nature Cell Biology*, 16(6), 595–606. <http://doi.org/10.1038/ncb2970>
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., & Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 Receptors and Detergent-Resistant Membrane Domains Define a Clathrin-Independent Endocytic Pathway. *Molecular Cell*, 7(3), 661–671. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00212-X](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00212-X)
- Lamaze, C., Fujimoto, L. M., Yin, H. L., & Schmid, S. L. (1997). The Actin Cytoskeleton Is Required for Receptor-mediated Endocytosis in Mammalian Cells. *Journal of Biological* 272(33):20332-20335
- Lasserre, R., Guo, X.-J., Conchonaud, F., Hamon, Y., Hawchar, O., Bernard, A.-M., et al. (2008). Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nature Chemical Biology*, 4(9), 538–547. <http://doi.org/10.1038/nchembio.103>
- Le Roy, C., & Wrana, J. L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(2), 112–126. <http://doi.org/10.1038/nrm1571>
- Lee, E., & Knecht, D. A. (2002). Visualization of Actin Dynamics During Macropinocytosis

- and Exocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(3), 186–192. <http://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.030304.x>
- Lee, M., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., & Schekman, R. (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell*, 122(4), 605–617. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.025>
- Lee, S., Park, J. B., Kim, J. H., Kim, Y., Kim, J. H., Shin, K. J., et al. (2001). Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(30), 28252–28260. <http://doi.org/10.1074/jbc.M008521200>
- Leventis, P. A., & Grinstein, S. (2010). The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annual Review of Biophysics*, 39(1), 407–427. <http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131234>
- Levi, S., Rawet, M., Kliouchnikov, L., Parnis, A., & Cassel, D. (2008). Topology of amphipathic motifs mediating Golgi localization in ArfGAP1 and its splice isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(13), 8564–8572. <http://doi.org/10.1074/jbc.M709738200>
- Lewis, W. H. (1931). Lewis: Pinocytosis
- Li, J., Barylko, B., Eichorst, J. P., Mueller, J. D., Albanesi, J. P., & Chen, Y. (2016). Association of Endophilin B1 with Cytoplasmic Vesicles. *Biophysical Journal*, 111(3), 565–576. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.06.017>
- Li, J., Mao, X., Dong, L. Q., Liu, F., & Tong, L. (2007). Crystal Structures of the BAR-PH and PTB Domains of Human APPL1. *Structure (London, England : 1993)*, 15(5), 525–533. <http://doi.org/10.1016/j.str.2007.03.011>
- Liberali, P., Kakkonen, E., Turacchio, G., Valente, C., Spaar, A., Perinetti, G., et al. (2008). The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *Embo Journal*, 27(7), 970–981. <http://doi.org/10.1038/emboj.2008.59>
- Linder, S. (2005). Podosomes at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(10), 2079–2082. <http://doi.org/10.1242/jcs.02390>
- Lingwood, D., & Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5961), 46–50. <http://doi.org/10.1126/science.1174621>
- Liu, A. P., Aguet, F., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2010). Local clustering of transferrin receptors promotes clathrin-coated pit initiation. *The Journal of Cell Biology*, 191(7), 1381–1393. <http://doi.org/10.1083/jcb.201008117>
- Liu, L., & Pilch, P. F. (2008). A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(7), 4314–4322. <http://doi.org/10.1074/jbc.M707890200>
- Loeblich, S., Benoit, M. R., Konopka, J. A., Cottrell, J. R., Gibson, J., & Nedivi, E. (2016). CPG2 Recruits Endophilin B2 to the Cytoskeleton for Activity-Dependent Endocytosis of Synaptic Glutamate Receptors. *Current Biology*, 26(3), 296–308. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.071>
- Loerke, D., Mettlen, M., Yarar, D., Jaqaman, K., Jaqaman, H., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2009). Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biology*, 7(3), e57. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000057>
- Lowe, M., & Kreis, T. E. (1995). In vitro assembly and disassembly of coatomer. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(52), 31364–31371.
- Ludwig, A., Nichols, B.J., Sandin, S. (2016). Architecture of the Caveolar Coat Complex, *The compagny of biologists - Journal of cell science*, 129, 3077-3083.
- Ludwig, A., Howard, G., Mendoza-Topaz, C., Deerinck, T., Mackey, M., Sandin, S., et al. (2013). Molecular Composition and Ultrastructure of the Caveolar Coat Complex. *PLoS Biology*, 11(8), e1001640.
- Lundmark, R., Doherty, G. J., Howes, M. T., Cortese, K., Vallis, Y., Parton, R. G., &

- McMahon, H. T. (2008). The GTPase-Activating Protein GRAF1 Regulates the CLIC/GEEC Endocytic Pathway. *Current Biology*, 18(22), 1802–1808. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.044>
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., & Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental Cell*, 10(6), 839–850. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.002>
- Malecz, N., McCabe, P. C., Spaargaren, C., Qiu, R.-G., Chuang, Y.-Y., & Symons, M. (2000). Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis. *Current Biology*, 10(21), 1383–1386.
- Mao, Y. X., Chen, J., Maynard, J. A., Zhang, B., & Quirocho, F. A. (2001). A novel all helix fold of the AP180 amino-terminal domain for phosphoinositide binding and clathrin assembly in synaptic vesicle endocytosis. *Cell*, 104(3), 433–440.
- Masuda, M., Takeda, S., Sone, M., Ohki, T., Mori, H., Kamioka, Y., & Mochizuki, N. (2006). Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms: Abstract: The EMBO Journal. *The EMBO Journal*, 25(12), 2889–2897. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601176>
- Masuda, M., & Mochizuki, N. (2010). Structural characteristics of BAR domain superfamily to sculpt the membrane. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(4), 391–398. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.01.010>
- Matta, S., Van Kolen, K., da Cunha, R., van den Bogaart, G., Mandemakers, W., Miskiewicz, K., et al. (2012). LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. *Neuron*, 75(6), 1008–1021. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.022>
- Mattila, P. K., Pykäläinen, A., Saarikangas, J., Paavilainen, V. O., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Lappalainen, P. (2007). Missing-in-metastasis and IRSp53 deform PI(4,5)P₂-rich membranes by an inverse BAR domain-like mechanism. *The Journal of Cell Biology*, 176(7), 953–964.
- Mayor, S., & Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(8), 603–612. <http://doi.org/10.1038/nrm2216>
- McCrae, C., Maxwell, L., & Ceredig, R. (1988). Intracellular pathway of interleukin-2 receptors studied using immunogold electron microscopy. *Immunology and Cell Biology*, 66 (Pt 3)(3), 185–191. <http://doi.org/10.1038/icb.1988.23>
- McNiven, M. (2000). The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(3), 115–120.
- Meinecke, M., Boucrot, E., Camdere, G., Hon, W.-C., Mittal, R., & McMahon, H. T. (2013). Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6651–6661. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.444869>
- Merrifield, C. J., Feldman, M. E., Wan, L., & Almers, W. (2002). Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nature Cell Biology*, 4(9), 691–698. <http://doi.org/10.1038/ncb837>
- Merrifield, C. J., Perrais, D., & Zenisek, D. (2005). Coupling between Clathrin-Coated-Pit Invagination, Cortactin Recruitment, and Membrane Scission Observed in Live Cells. *Cell*, 121(4), 593–606. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.015>
- Mesmin, B., Drin, G., Levi, S., Rawet, M., Cassel, D., Bigay, J., & Antonny, B. (2007). Two Lipid-Packing Sensor Motifs Contribute to the Sensitivity of ArfGAP1 to Membrane Curvature †. *Biochemistry*, 46(7), 1779–1790. <http://doi.org/10.1021/bi062288w>
- Millard, T. H., Bompard, G., Heung, M. Y., Dafforn, T. R., Scott, D. J., Machesky, L. M., & Fütterer, K. (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *Embo Journal*, 24(2), 240–250. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600535>

- 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*, 88(5), 1708–1717.
- Morelon, E., & Dautry-Varsat, A. (1998). Endocytosis of the Common Cytokine Receptor cChain: Identification of sequences involved in internalization and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 22044–22051. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.34.22044>
- Moren, B., Shah, C., Howes, M. T., Schieber, N. L., McMahon, H. T., Parton, R. G., et al. (2012). EHD2 regulates caveolar dynamics via ATP-driven targeting and oligomerization. *Molecular Biology of the Cell*, 23(7), 1316–1329. <http://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0787>
- Morlot, S., Galli, V., Klein, M., Chiaruttini, N., Manzi, J., Humbert, F., et al. (2012). Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell*, 151(3), 619–629. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.017>
- Oh, P., McIntosh, D. P., & Schnitzer, J. E. (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*, 141, (1), 101–114.
- Orci, L., Glick, B. S., & Rothman, J. E. (1986). A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: Its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell*, 46(2), 171–184. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90734-8](http://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90734-8)
- Ory, S., Ceridono, M., Momboisse, F., Houy, S., Chasserot-Golaz, S., Heintz, D., et al. (2013). Phospholipid Scramblase-1-Induced Lipid Reorganization Regulates Compensatory Endocytosis in Neuroendocrine Cells. *Journal of Neuroscience*, 33(8), 3545–3556. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3654-12.2013>
- Papahadjopoulos, D., Poste, G., & Schaeffer, B. E. (1973). Fusion of Mammalian-Cells by Unilamellar Lipid Vesicles : Influence of Lipid Surface Charge, Fluidity and Cholesterol. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 323(1), 23–42.
- Park, R., Shen, H., Liu, L., Liu, X., Ferguson, S. M., & De Camilli, P. (2013). Dynamin triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamin inhibitors. *Journal of Cell Science*. 126: 5305-5312 <http://doi.org/10.1242/jcs.138578>
- Pearse, B. M. (1975). Coated Vesicles From Pig Brain: Purification and Biochemical Characterization. *Journal of Molecular Biology*, 97(1), 93–98.
- Pearse, B. M. (1976). Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Pnas*, 73(4), 1255–1259.
- Perrais, D., & Merrifield, C. J. (2005). Dynamics of Endocytic Vesicle Creation. *Developmental Cell*, 9(5), 581–592. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.10.002>
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5657), 495–499. <http://doi.org/10.1126/science.1092586>
- Picas, L., Viaud, J., Schauer, K., Vanni, S., Hnia, K., Fraisier, V., et al. (2014). BIN1/M-Amphiphysin2 induces clustering of phosphoinositides to recruit its downstream partner dynamin. *Nature Communications*, 5, 1–12. <http://doi.org/10.1038/ncomms6647>
- Poorthuis, B. J., & Hostetler, K. Y. (1976). Studies on the subcellular localization and properties of bis(monoacylglyceryl)phosphate biosynthesis in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(15), 4596–4602.
- Poudel, K. R., Dong, Y., Yu, H., Su, A., Ho, T., Liu, Y., et al. (2016). A time course of orchestrated endophilin action in sensing, bending, and stabilizing curved membranes. *Molecular Biology of the Cell*, 27(13), 2119–2132. <http://doi.org/10.1091/mbc.E16-04-0264>

- Putta, P., Rankenberg, J., Korver, R. A., van Wijk, R., Munnik, T., Testerink, C., & Kooijman, E. E. (2016). Phosphatidic acid binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical properties *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Biomembranes*, 1858(11), 2709–2716. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.07.014>
- Pykäläinen, A., Boczkowska, M., Zhao, H., Saarikangas, J., Rebowski, G., Jansen, M., et al. (2011). Pinkbar is an epithelial-specific BAR domain protein that generates planar membrane structures. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(8), 902–907. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2079>
- Pylypenko, O., Lundmark, R., Rasmuson, E., Carlsson, S. R., & Rak, A. (2007). The PX-BAR membrane-remodeling unit of sorting nexin 9. *The EMBO Journal*, 26(22), 4788–4800. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601889>
- Qualmann, B., & Kelly, R. B. (2000). Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *The Journal of Cell Biology*, 148(5), 1047–1061.
- Qualmann, B., Koch, D., & Kessels, M. M. (2011). Focus Review Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *The EMBO Journal*, 30(17), 3501–3515. <http://doi.org/10.1038/emboj.2011.266>
- Ramachandran, R., & Schmid, S. L. (2008). Real-time detection reveals that effectors couple dynamin's GTP-dependent conformational changes to the membrane. *EMBO journal*, 27(1), 27–37. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601961>
- Rao, Y., & Haucke, V. (2011). Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(24), 3983–3993. <http://doi.org/10.1007/s00018-011-0768-5>
- Renard, H.-F., Simunovic, M., Lemièrre, J., Boucrot, E., Garcia-Castillo, M. D., Arumugam, S., et al. (2015). Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature*, 517(7535), 493–496. <http://doi.org/10.1038/nature14064>
- Rocca, A., Lamaze, C., Subtil, A., & Dautry-Varsat, A. (2001). Involvement of the Ubiquitin/Proteasome System in Sorting of the Interleukin 2 Receptor Chain to Late Endocytic Compartments. *Molecular Biology of the Cell*, 12(5), 1293–1301. <http://doi.org/10.1091/mbc.12.5.1293>
- Rosenthal, J. A., Chen, H., Slepnev, V. I., Pellegrini, L., Salcini, A. E., Di Fiore, P. P., & 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*, 274(48), 33959–33965.
- Roth, T. F., & Porter, K. R. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito aedes aegypti. L. *The Journal of Cell Biology*, 20, 313–332.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R., & Anderson, R. (1992). Caveolin, a Protein-Component of Caveolae Membrane Coats. *Cell*, 68(4), 673–682.
- Roux, A. E. L., & Plastino, J. (2010). Actin takes its hat off to dynamin. *The EMBO Journal*, 29(21), 3591–3592. <http://doi.org/10.1038/emboj.2010.263>
- Saarikangas, J., Zhao, H., Pykäläinen, A., Laurinmäki, P., Mattila, P. K., Kinnunen, P. K. J., et al. (2009). Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Current Biology: CB*, 19(2), 95–107. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.029>
- Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G., & Mayor, S. (2002). GPI-Anchored Proteins Are Delivered to Recycling Endosomes via a Distinct cdc42-Regulated, Clathrin-Independent Pinocytic Pathway. *Developmental Cell*, 2(4), 411–423. [http://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00145-4](http://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00145-4)
- Salim, K., Bottomley, M. J., Querfurth, E., Zvelebil, M. J., Gout, I., Scaife, R., et al. (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *Embo Journal*, 15(22), 6241–6250.

- Sauvonnet, N., Dujeancourt, A., & Dautry-Varsat, A. (2005). Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *The Journal of Cell Biology*, 168(1), 155–163. <http://doi.org/10.1083/jcb.200406174>
- Schlame, M., & Greenberg, M. L. (2016). Biosynthesis, remodeling and turnover of mitochondrial cardiolipin, *Biochimica et Biophysica Acta. BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.08.010>
- Schluns, K. S., & Lefrançois, L. (2003). Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nature Reviews Immunology*, 3(4), 269–279. <http://doi.org/10.1038/nri1052>
- Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., et al. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*, 401(6749), 133–141. <http://doi.org/10.1038/43613>
- Sciorra, V. A., Rudge, S. A., Prestwich, G. D., Frohman, M. A., Engebrecht, J., & Morris, A. J. (1999). Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes. *The EMBO Journal*, 18(21), 5911–5921. <http://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5911>
- Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., & Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6188), 1164–1168. <http://doi.org/10.1126/science.1252809>
- Semenzato, G., Pizzolo, G., & Zambello, R. (1992). The Interleukin-2 Interleukin-2 Receptor System - Structural, Immunological, and Clinical-Features. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 22(3), 133–142.
- Sezgin, E., Kaiser, H.-J., Baumgart, T., Schwille, P., Simons, K., & Levental, I. (2012). Elucidating membrane structure and proteinbehavior using giant plasma membrane vesicles. *Nature Protocols*, 7(6), 1042–1051. <http://doi.org/10.1038/nprot.2012.059>
- Sezgin, E., Gutmann, T., Buhl, T., Dirx, R., Grzybek, M., Coskun, U., Solimena, M., Simons, K., Levental, I., Schwille, P. (2015). Adaptive Lipid Packing and Bioactivity in Membrane Domains, 1–14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0123930>
- Shin, N., Ahn, N., Chang-Ileto, B., Park, J., Takei, K., Ahn, S.-G., et al. (2008). SNX9 regulates tubular invagination of the plasma membrane through interaction with actin cytoskeleton and dynamin 2. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 8), 1252–1263. <http://doi.org/10.1242/jcs.016709>
- Shinozaki-Narikawa, N., Kodama, T., & Shibasaki, Y. (2006). Cooperation of Phosphoinositides and BAR Domain Proteins in Endosomal Tubulation. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(11), 1539–1550. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2006.00480.x>
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4023), 720–731. <http://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>
- Simons, K., & Sampaio, J. L. (2011). Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(10), a004697–a004697. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>
- Solomaha, E., & Palfrey, H. C. (2005). Conformational changes in dynamin on GTP binding and oligomerization reported by intrinsic and extrinsic fluorescence. *Biochemical Journal*, 391(Pt 3), 601–611. <http://doi.org/10.1042/BJ20050707>
- Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., & Dikic, I. (2002). Cbl–CIN85–endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*, 416(6877), 183–187. <http://doi.org/10.1038/416183a>
- Soulet, F., Yazar, D., Leonard, M., & Schmid, S. L. (2005). SNX9 regulates dynamin assembly and is required for efficient clathrin-mediated endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*,

- 16(4), 2058–2067.
- Stahelin, R. V., Long, F., Peter, B. J., Murray, D., De Camilli, P., McMahon, H. T., & Cho, W. (2003). Contrasting Membrane Interaction Mechanisms of AP180 N-terminal Homology (ANTH) and Epsin N-terminal Homology (ENTH) Domains. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 28993–28999. <http://doi.org/10.1074/jbc.M302865200>
- Stoeber, M., Stoeck, I. K., Hänni, C. H. A., Bleck, C. K. E., Balistreri, G., & Helenius, A. (2012). Oligomers of the ATPase EHD2 confine caveolae to the plasma membrane through association with actin. *The EMBO Journal*, 31, 2350–2364. <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.98>
- Straub. (1942). Studies Vol II, 1–15.
- Straub, F. B., & Feuer, G. (1950). Adenosinetriphosphate the functional group of actin. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 4, 455–470.
- Suarez, A., Ueno, T., Huebner, R., McCaffery, J. M., & Inoue, T. (2014). Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) family members bend membranes in cells. *Nature Publishing Group*, 4. <http://doi.org/10.1038/srep04693>
- Subtil, A., Rocca, A., & Dautry-Varsat, A. (1998). Molecular characterization of the signal responsible for the targeting of the interleukin 2 receptor beta chain toward intracellular degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29424–29429.
- 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*, 136(3), 583–595. Retrieved from <http://hal-pasteur.archives-ouvertes.fr/docs/00/37/27/97/PDF/JCB1997.pdf>
- Subtil, A., Hémar, A., & Dautry-Varsat, A. (1994). Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *Journal of Cell Science*. 107, 3461–3468
- Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., et al. (2006). The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 35347–35358. <http://doi.org/10.1074/jbc.M606814200>
- Sundborger, A., Soderblom, C., Vorontsova, O., Evergren, E., Hinshaw, J. E., & Shupliakov, O. (2011). An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *Journal of Cell Science*, 124(1), 133–143. <http://doi.org/10.1242/jcs.072686>
- Sung, T. C., Altshuller, Y. M., Morris, A. J., & Frohman, M. A. (1999a). Molecular Analysis of Mammalian Phospholipase D2. *Journal of Biological Chemistry*, 274(1), 494–502. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.1.494>
- Sung, T. C., Zhang, Y., Morris, A. J., & Frohman, M. A. (1999b). Structural Analysis of Human Phospholipase D1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3659–3666. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3659>
- Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L., & Helenius, A. (2005). Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *The Journal of Cell Biology*, 170(5), 769–779. <http://doi.org/10.1083/jcb.200506103>
- Takahashi, Y., Meyerkord, C. L., & Wang, H.-G. (2009). Bif-1/Endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy, 16(7), 947–955. <http://doi.org/10.1038/cdd.2009.19>
- Takano, K., Toyooka, K., & Suetsugu, S. (2008). EFC/F-BAR proteins and the N-WASP–WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *The EMBO Journal*, 27(24), 2817–2828. <http://doi.org/10.1038/emboj.2008.255>
- Tang, Y., Hu, L. A., Miller, W. E., Ringstad, N., Hall, R. A., Pitcher, J. A., et al. (1999). Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel binding partners for the beta1-adrenergic receptor. *Pnas*, 96(22), 12559–12564.

- Taylor, M. J., Perrais, D., & Merrifield, C. J. (2011). A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLoS Biology*, 9(3), e1000604.
- Teasdale, R. D., & Collins, B. M. (2012). Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochemical Journal*, 441(1), 39–59. <http://doi.org/10.1042/BJ20111226>
- Timm, D., Salim, K., Gout, I., Guruprasad, L., Waterfield, M., & Blundell, T. (1994). Crystal-Structure of the Pleckstrin Homology Domain From Dynamin. *Nature Structural Biology*, 1(11), 782–788.
- Tsuboi, S., Takada, H., Hara, T., Mochizuki, N., Funyu, T., Saitoh, H., et al. (2009). FBP17 Mediates a Common Molecular Step in the Formation of Podosomes and Phagocytic Cups in Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8548–8556. <http://doi.org/10.1074/jbc.M805638200>
- Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., Takenawa, T. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 172(2), 269–279.
- Vallis, Y., Wigge, P., Marks, B., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (1999). Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Current Biology*, 9(5), 257–263.
- van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A. M., & Sandvig, K. (2003). Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends in Cell Biology*, 13(2), 92–100.
- van Meer, G., & de Kroon, A. I. P. M. (2011). Lipid map of the mammalian cell. *Journal of Cell Science*, 124(1), 5–8. <http://doi.org/10.1242/jcs.071233>
- van Meer, G., & Sprong, H. (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 373–378. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.004>
- van Weering, J. R. T., Sessions, R. B., Traer, C. J., Kloer, D. P., Bhatia, V. K., Stamou, D., et al. (2012). Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules. *The EMBO Journal*, 31(23), 4466–4480. <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.283>
- Vanni, S. S., Vamparys, L. L., Gautier, R. R., Drin, G. G., Etchebest, C. C., Fuchs, P. F. J. P., & Antonny, B. B. (2013). Amphipathic lipid packing sensor motifs: probing bilayer defects with hydrophobic residues. *Biophysical Journal*, 104(3), 575–584. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3837>
- Vannier, C., Pesty, A., San-Roman, M. J., & Schmidt, A. A. (2013). The Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein endophilin B2 interacts with plectin and controls perinuclear cytoskeletal architecture. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(38), 27619–27637. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.485482>
- Vehlow, A., Soong, D., Vizcay-Barrena, G., Bodo, C., Law, A.-L., Perera, U., & Krause, M. (2013). Endophilin, Lamellipodin, and Mena cooperate to regulate F-actin-dependent EGF-receptor endocytosis. *The EMBO Journal*, 32(20), 2722–2734. <http://doi.org/10.1038/emboj.2013.212>
- Vieira, O. V., Botelho, R. J., Rameh, L., Brachmann, S. M., Matsuo, T., Davidson, H. W. et al. (2001). Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *The Journal of Cell Biology*, 155(1), 19–25.
- Wang, J. T. H., Kerr, M. C., Karunaratne, S., Jeanes, A., Yap, A. S., & Teasdale, R. D. (2010). The SNX-PX-BAR Family in Macropinocytosis: The Regulation of Macropinosome Formation by SNX-PX-BAR Proteins. *Plos One*, 5(10), e13763. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0013763.g006>
- Wang, Y.-H., Wang, J.-Q., Wang, Q., Wang, Y., Guo, C., Chen, Q., et al. (2016). Endophilin B2 promotes inner mitochondrial membrane degradation by forming heterodimers with

- Endophilin B1 during mitophagy. *Nature Publishing Group*, 1–13. <http://doi.org/10.1038/srep25153>
- Waters, M. G., Serafini, T., & Rothman, J. E. (1991). “Coatomer”: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, 349(6306), 248–251. <http://doi.org/10.1038/349248a0>
- Wendland, B., Emr, S. D., & Riezman, H. (1998). Protein traffic in the yeast endocytic and vacuolar protein sorting pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(4), 513–522.
- Wong, W. T., Schumacher, C., Salcini, A. E., Romano, A., Castagnino, P., Pelicci, P. G., & Di Fiore, P. P. (1995). A protein-binding domain, EH, identified in the receptor tyrosine kinase substrate Eps15 and conserved in evolution. *Pnas*, 92(21), 9530–9534.
- Wu, X. Y., Suetsugu, S., Cooper, L. A., Takenawa, T., & Guan, J. L. (2004). Focal adhesion kinase regulation of N-WASP subcellular localization and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9565–9576. <http://doi.org/10.1074/jbc.M310739200>
- Wu, X., Gan, B., Yoo, Y., & Guan, J.-L. (2005). FAK-Mediated Src Phosphorylation of Endophilin A2 Inhibits Endocytosis of MT1-MMP and Promotes ECM Degradation. *Developmental Cell*, 9(2), 185–196. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.06.006>
- Yamashiro-Matsumura, S., & Matsumura, F. (1985). Purification and Characterization of an F-Actin-Bundling 55-Kilodalton Protein From Hela-Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(8), 5087–5097.
- Yin, Y., Arkhipov, A., & Schulten, K. (2009). Simulations of Membrane Tubulation by Lattices of Amphiphysin N-BAR Domains. *Structure/Folding and Design*, 17(6), 882–892. <http://doi.org/10.1016/j.str.2009.03.016>
- Yoon, M.-S., Du, G., Backer, J. M., Frohman, M. A., & Chen, J. (2011). Class III PI-3-kinase activates phospholipase D in an amino acid-sensing mTORC1 pathway. *The Journal of Cell Biology*, 195(3), 435–447. <http://doi.org/10.1083/jcb.201107033>
- Yoon, Y., Tong, J., Lee, P. J., Albanese, A., Bhardwaj, N., Källberg, M., et al. (2010). Molecular Basis of the Potent Membrane-remodeling Activity of the Epsin 1 N-terminal Homology Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 531–540. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.068015>
- Zhang, C., Li, A., Zhang, X., & Xiao, H. (2011). A novel TIP30 protein complex regulates EGF receptor signaling and endocytic degradation. *Journal of Biological Chemistry*.
- Zhang, J., Zheng, X., Yang, X., & Liao, K. (2009). CIN85 associates with endosomal membrane and binds phosphatidic acid. *Cell Research*, 19(6), 733–746. <http://doi.org/10.1038/cr.2009.51>
- Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D., Palvetich, N.P. (2000). Structure of a c-CBL-UbcH7 complex: RING Domain Function in Ubiquitin- Protein Ligases, *Cell*, 102, 533–535
- Zhao, H., Michelot, A., Koskela, E. V., Tkach, V., Stamou, D., Drubin, D., & Lappalainen, P. (2012). Membrane-sculpting BAR and F-BAR domains generate stable lipid microdomains. *Cell reports* 4, 1213–1223.
- Zhou, Q., Sims, P. J., & Wiedmer, T. (1998). Identity of a conserved motif in phospholipid scramblase that is required for Ca²⁺-accelerated transbilayer movement of membrane phospholipids. *Biochemistry*, 37(8), 2356–2360. <http://doi.org/10.1021/bi972625o>

Annexes

Article #1 **Endophilin marks- and controls- clathrin independent pathway** (Nature, 2015)

Emmanuel Boucrot, Antonio P. A. Ferreira, Leonardo Almeida-Souza, Sylvain Debard, Yvonne Vallis, Gillian Howard, Laetitia Bertot, Nathalie Sauvonnet & Harvey T. McMahon.

Article #2 **dynamin and endophilin have distinct orchestrations during clathrin-dependent and –independent endocytosis (titre provisoire, article en préparation)**

Laetitia Bertot*, Alexandre Grassart*, Thibault Lagache*, Giacomo Nardi*, Jean-Christophe Olivo-Marin et Nathalie Sauvonnet

Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway

Emmanuel Boucrot^{1,2}, Antonio P. A. Ferreira², Leonardo Almeida-Souza¹, Sylvain Debard^{2,3}, Yvonne Vallis¹, Gillian Howard¹, Laetitia Bertot⁴, Nathalie Sauvonnet⁴ & Harvey T. McMahon¹

Endocytosis is required for internalization of micronutrients and turnover of membrane components. Endophilin has been assigned as a component of clathrin-mediated endocytosis. Here we show in mammalian cells that endophilin marks and controls a fast-acting tubulovesicular endocytic pathway that is independent of AP2 and clathrin, activated upon ligand binding to cargo receptors, inhibited by inhibitors of dynamin, Rac, phosphatidylinositol-3-OH kinase, PAK1 and actin polymerization, and activated upon Cdc42 inhibition. This pathway is prominent at the leading edges of cells where phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate—produced by the dephosphorylation of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate by SHIP1 and SHIP2—recruits lamellipodin, which in turn engages endophilin. This pathway mediates the ligand-triggered uptake of several G-protein-coupled receptors such as α_{2a} - and β_1 -adrenergic, dopaminergic D3 and D4 receptors and muscarinic acetylcholine receptor 4, the receptor tyrosine kinases EGFR, HGFR, VEGFR, PDGFR, NGFR and IGF1R, as well as interleukin-2 receptor. We call this new endocytic route fast endophilin-mediated endocytosis (FEME).

The BAR (Bin/amphiphysin/Rvs)-domain-containing protein endophilin-A (hereafter called endophilin) is an endocytic protein that recruits dynamin and synaptojanin¹, and the disruption of which has a profound effect on endocytosis in mice, nematodes and flies^{2–5}. Evidence for its involvement in clathrin-mediated endocytosis came from BAR domain and antibody injection experiments in lamprey synapses, resulting in an accumulation of early- and late-stage clathrin-coated pits and a corresponding decrease in the number of synaptic vesicles^{6–9}. Furthermore, endophilin has been detected on clathrin-coated pits by immuno-electron microscopy and fluorescence microscopy^{5,9–12}. However, several lines of evidence suggest a peripheral role for endophilin in clathrin-mediated endocytosis: it was only detected in one-quarter of forming clathrin-coated pits^{10,12}; triple knockdown (TKD) of all three endophilin-A proteins (A1, A2 and A3) by RNA interference (RNAi) does not affect the uptake of the clathrin-mediated endocytosis cargo transferrin¹³; and the kinetics of synaptic vesicle retrieval in goldfish bipolar neurons inhibited by endophilin N-BAR domain injection (BAR domain with its amino-terminal amphipathic helix extensions) was distinct from that inhibited by a peptide inhibitor of clathrin-mediated endocytosis^{14,15}. Interestingly, endophilin binds directly to a proline-rich motif present in the third intracellular loop (TIL) of the β_1 -adrenergic receptor (β_1 -AR) but not the β_2 -AR (ref. 16), both being members of the G-protein-coupled receptor (GPCR) superfamily. Endophilin also binds to EGFR and HGFR through CIN85 and Cbl (refs 17, 18). Here we reveal that endophilin is not simply a peripheral component of clathrin-mediated endocytosis but principally marks and controls a distinct endocytic pathway.

Endophilin-dependent endocytosis of GPCR

Looking for cargoes that can bind to the SH3 domain of endophilin, we found that in addition to β_1 -AR, endophilin bound strongly to discrete proline-rich motifs within the TIL of the α_{2a} -AR, dopaminergic receptors 3 and 4 (DR3 and DR4) and to the muscarinic acetylcholine receptor 4 (mAChR4), and weakly to the histaminergic receptors 1 and 3 but not

to the other members of the amine GPCR sub-family tested (Fig. 1a and Extended Data Fig. 1a–e). The internalization of β_1 -AR in an antibody-feeding assay was strongly decreased in endophilin TKD but not in clathrin or AP2-depleted cells, suggesting an endocytic route independent of clathrin-mediated endocytosis (Fig. 1b). Among the five endophilin genes, A2 was the most important in BSC1 cells, followed by A1, with little or no role for A3, B1 and B2. The uptake of β_1 -AR required full-length A2 and its N-BAR or SH3 domains could not rescue the endophilin TKD (Fig. 1b). Consistent with the binding data, only internalization of β_1 -AR and α_{2a} -AR, DR3, DR4, and mAChR4 was significantly reduced in endophilin TKD cells (Extended Data Fig. 1m, n). These endocytic defects were only observed after ligand stimulation, implicating endophilin in receptor-mediated endocytosis initiated upon receptor activation by their ligands. Endophilin TKD cells showed unperturbed uptake of transferrin and LDL receptors (cargo for clathrin-mediated endocytosis), but clathrin-coated pits formed at a slightly slower rate (Extended Data Fig. 1f–i), perhaps related to a reduced synaptojanin recruitment to membranes and thus an increase in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) levels^{5,19}. Surface β_1 -AR accumulated mostly at the leading edge of endophilin TKD cells, which coincided with the localization of most of the endophilin signal in control cells (Fig. 1c, Extended Data Figs 1j–l and 2 and Supplementary Video 1). Consistent with the virtual absence of clathrin-coated pits and vesicles at the leading edge (Extended Data Fig. 2e), endogenous endophilin showed little co-localization with AP2 ($2 \pm 0.1\%$ of endogenous AP2 spots), much lower than observed for endophilin overexpression data ($\sim 5\%$ on snapshot confocal images and a brief flash just before budding in $\sim 25\%$ of recorded clathrin-coated vesicle budding kymographs, in agreement with previous studies^{10,12}). In confluent cells, which lack leading edges, endophilin puncta were interspersed with clathrin-coated pits on the ventral surface (Extended Data Fig. 2i, j and Supplementary Video 2).

Endophilin co-localized at the leading edge with its binding proteins (dynamin, synaptojanin, lamellipodin) and with F-actin but not with the clathrin-independent endocytic proteins caveolin-1, flotillin1/2 or

¹MRC Laboratory of Molecular Biology, Francis Crick Avenue, Cambridge CB2 0QH, UK. ²Institute of Structural and Molecular Biology, University College London & Birkbeck College, London WC1E 6BT, UK.

³Department of Biology, Ecole Normale Supérieure de Cachan, 94235 Cachan, France. ⁴Institut Pasteur, Unité de Pathogénie Moléculaire Microbienne, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

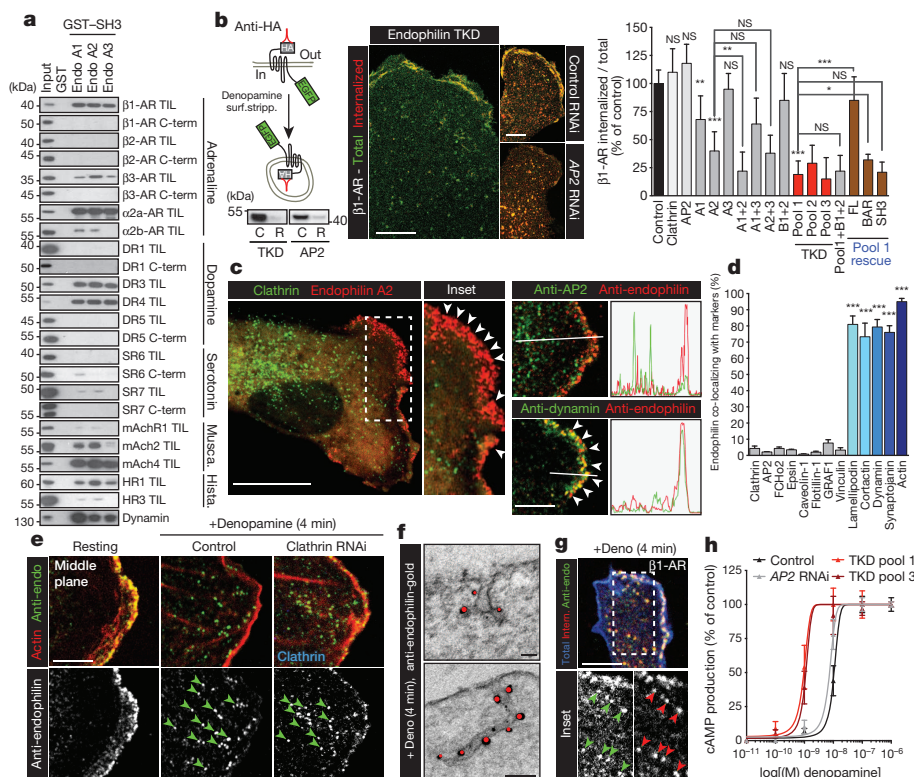


Figure 1 | Clathrin-independent, endophilin-dependent endocytosis of GPCR. **a**, Pull-down experiments with EGFP-tagged third intracellular loops (TIL) or C termini of indicated GPCRs. **b**, Left: antibody feeding assay using double-tagged β_1 -AR. HA antibodies are internalized after denopamine stimulation and non-internalized antibody was removed by surface stripping (surf.stripp.). Bottom: immunoblots from control (C) and RNAi (R) endophilin TKD and AP2-depleted cells. Right: confocal microscopy images of internalized (red) and total (green) β_1 -AR-EGFP (images are representative of at least ten captures from three independent experiments). Bar graphs show the amounts of internalized receptors corrected for their total levels in the indicated samples (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments; NS, non-significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; one-way ANOVA and Dunnett's test versus control or versus A2 or TKD pool 1, as indicated by the brackets). FL, full length. **c**, Confocal sections showing localization of endophilin-A2-RFP (left) or endogenous endophilin (right) with clathrin (EGFP-LCa), AP2 or dynamin in BSC1 cells (images are

representative of at least ten captures from three independent experiments). Intensity profiles were acquired along the indicated lines. Arrowheads show leading edge. **d**, Percentage of endogenous endophilin spots co-localizing with the named markers (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments; *** $P < 0.001$, one-way ANOVA and Dunnett's test versus control IgG). **e**, Confocal sections of cells immunostained for endophilin (green) and actin (red) following the indicated treatments. Arrowheads show endophilin-positive assemblies (EPAs) (images are representative of at least ten captures from three independent experiments). **f**, Immuno-electron microscopy of BSC1 cells immunostained for endophilin (red) (images are representative of ten captures from two independent experiments). **g**, Co-staining of internalized β_1 -AR and endogenous endophilin after stimulation. Blue, total β_1 -AR (images are representative of ten captures from two independent experiments). **h**, cAMP production following stimulation with denopamine (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments). Scale bars: 20 μ m (c, left), 10 μ m (b), 5 μ m (c, right, e, g) and 250 nm (f).

GRAF1 (refs 20–22) (Fig. 1c, d and Extended Data Fig. 3). As the depletion of the latter did not affect endophilin signals or internalization of the five GPCRs identified, it suggested a hitherto novel endocytic process.

Very shortly ($t_{1/2} = 7$ s) after addition of β_1 -AR but not β_2 -AR agonists, numerous endophilin-RFP-positive assemblies (EPAs) emanated from the cell edges and rapidly ($1.62 \pm 0.29 \mu\text{m s}^{-1}$) travelled to the perinuclear area (Extended Data Fig. 4a, b and Supplementary Video 3). The formation of intracellular tubules and vesicles positive for endogenous endophilin after β_1 -AR-specific activation was confirmed by confocal and electron microscopy (Fig. 1e–g and Extended Data Fig. 4c–o). EPAs were quantified on middle confocal planes and the vesicles/tubules formed were probably detached as they were no longer accessible to externally applied dyes.

Consistently with the absence of co-localization, EPA formation was unaffected by the inhibition of clathrin-mediated endocytosis by AP180 carboxy terminus overexpression or by RNAi of the clathrin-mediated endocytosis components clathrin heavy chain or AP2 (Extended Data Fig. 4g and j). As expected from the binding data, only the overexpression of TILs from the receptors that bound to endophilin perturbed EPA formation (Extended Data Fig. 5a, b). EPAs formed upon β_1 -AR activation were confirmed as authentic endocytic carriers because in the antibody-feeding assay they contained anti-HA antibodies (Fig. 1g).

Finally, signal transduction downstream of β_1 -AR (cAMP production and PKA-mediated CREB phosphorylation) was elevated in endophilin TKD cells (Fig. 1h and Extended Data Fig. 5c, d), suggesting that EPAs mediate the downregulation of activated β_1 -AR. Even though β -arrestin, a key clathrin-mediated endocytosis adaptor for β_2 -AR, was located at the edge of cells, it was not detected on EPAs, nor did its overexpression or depletion perturb EPA formation after β_1 -AR stimulation (Extended Data Fig. 5e–h). Given that these EPAs form rapidly in an actin- and dynamin-dependent manner (see below), we named this new, clathrin-independent internalization route fast endophilin-mediated endocytosis (FEME), as distinct from clathrin-mediated endocytosis (CME).

Receptor-tyrosine kinase uptake by FEME

As removal of serum (hence of growth factors) from the culture medium or addition of extra serum strongly decreased or increased, respectively, the formation of EPAs (Fig. 2a), we assessed the capacity of various growth factors to activate FEME. Addition of EGF, HGF, FGF, VEGF, PDGF, NGF and IGF-1 but not TGF- β or BMP2 induced the formation of EPAs in three different cell lines, including primary fibroblasts from adult donors (Fig. 2a–c, Extended Data Fig. 6a–d and Supplementary Video 4). EGF induced the formation of EPAs in a dose-dependent manner and for prolonged periods of time. Fluorescently

labelled EGF or antibodies specific to the extracellular part of EGFR added to the extracellular medium, but not the β_1 -AR, could be detected within EPAs only upon stimulation with EGF (Fig. 2d, e and Extended Data Fig. 6e), establishing that a receptor must be activated by its cognate ligand to become a FEME cargo.

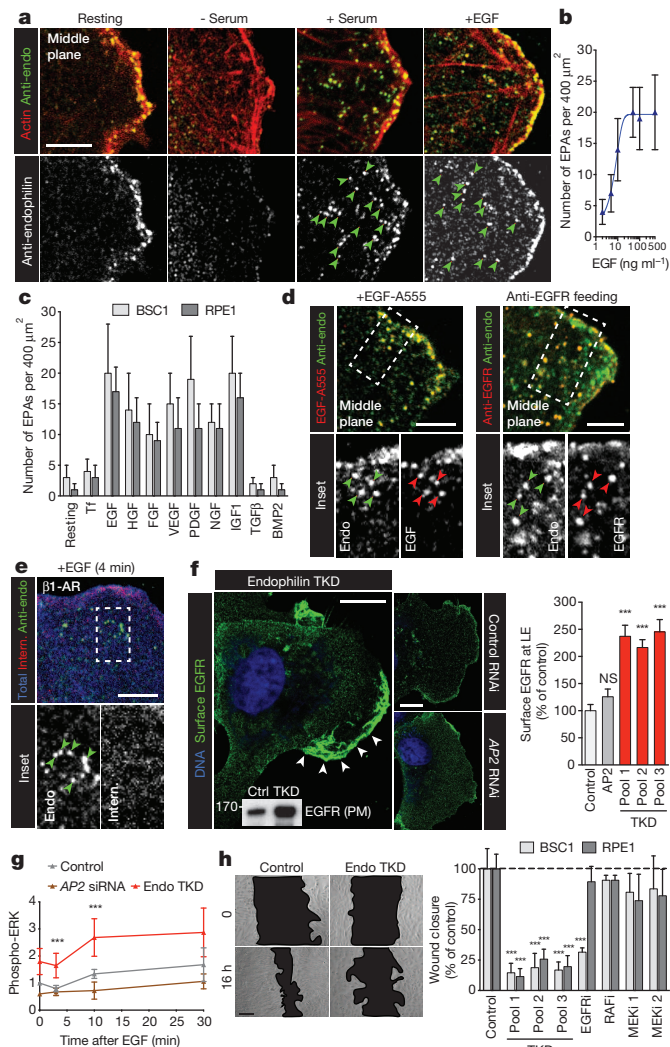


Figure 2 | Endocytosis of RTKs by the FEME pathway. **a**, Confocal sections of cells immunostained for endophilin and actin following the indicated treatments. Arrowheads show EPAs. Images are representative of at least ten captures from three independent experiments. **b**, **c**, Quantification of the number of EPAs after 4 min stimulation with various EGF concentrations (**c**) or 10 ng ml⁻¹ of the indicated growth factors (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments). **d**, **e**, Co-staining of internalized Alexa555-labelled EGF (**d**, left), anti-EGFR antibody (+EGF; **d**, right) or β_1 -AR (+EGF; **e**) and endogenous endophilin. Arrowheads show EPAs (images are representative of ten captures from three independent experiments). **f**, Cell surface staining of endogenous EGFR in resting control, AP2 or endophilin TKD cells (images are representative of ten captures from three independent experiments). Immunoblot shows the amount of EGFR in plasma membrane (PM) fractions of control or endophilin TKD cells. Bar graph shows the quantification of surface EGFR signals at the cell leading edge (LE) in the indicated conditions (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments; NS, non-significant; *** P < 0.001, one-way ANOVA and Dunnett's test versus control). **g**, Levels of phosphorylated Erk1/2 in control, AP2 RNAi or TKD cells upon stimulation with 5 ng ml⁻¹ EGF, determined on immunoblots (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments; *** P < 0.001, one-way ANOVA and Dunnett's test versus control t = 0). **h**, Cell migration into wound sites in samples treated with the indicated RNAi or inhibitors (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments; *** P < 0.001, one-way ANOVA and Dunnett's test versus respective control). Scale bars: 20 μ m (**h**), 10 μ m (**f**) and 5 μ m (**a**, **d**, **e**).

Consistent with the binding of endophilin to EGFR and HGFR through CIN85 and Cbl (refs 17,18), depletion of CIN85 or Cbl, or overexpression of a mutant form of CIN85 (which binds Cbl but not endophilin), inhibited EPA formation upon EGF or HGF stimulation but not β_1 -AR stimulation (Extended Data Fig. 6f).

EGFR, similarly to β_1 -AR, accumulated at the plasma membrane of endophilin TKD cells (Fig. 2f), which resulted in elevated downstream MAPK signalling during the first 10 min of stimulation (Fig. 2g and Extended Data Fig. 7a–g), indicating that endophilin was necessary for maintaining a low basal activation state.

We found that concentrations of EGF over 5 ng ml⁻¹ were required for full stimulation of EPAs (Fig. 2b), consistent with dynamin-dependent, clathrin-independent endocytic pathway(s) downregulating EGFR signalling at these concentrations²³ (clathrin-mediated endocytosis can function at ≤ 2 ng ml⁻¹ EGF concentrations). However, MAPK signalling was downregulated in endophilin TKD cells upon 30 min of high (100 ng ml⁻¹) EGF stimulation (Extended Data Figs 6g–j and 7c), indicating that another endocytic process, probably macropinocytosis, is then mediating EGFR uptake. Notably, FEME carriers and macropinocytosis co-exist but are morphologically distinct—small, <1 μ m, tubules and vesicles compared with large (2–10 μ m) ruffles and pinosomes (Extended Data Fig. 6k).

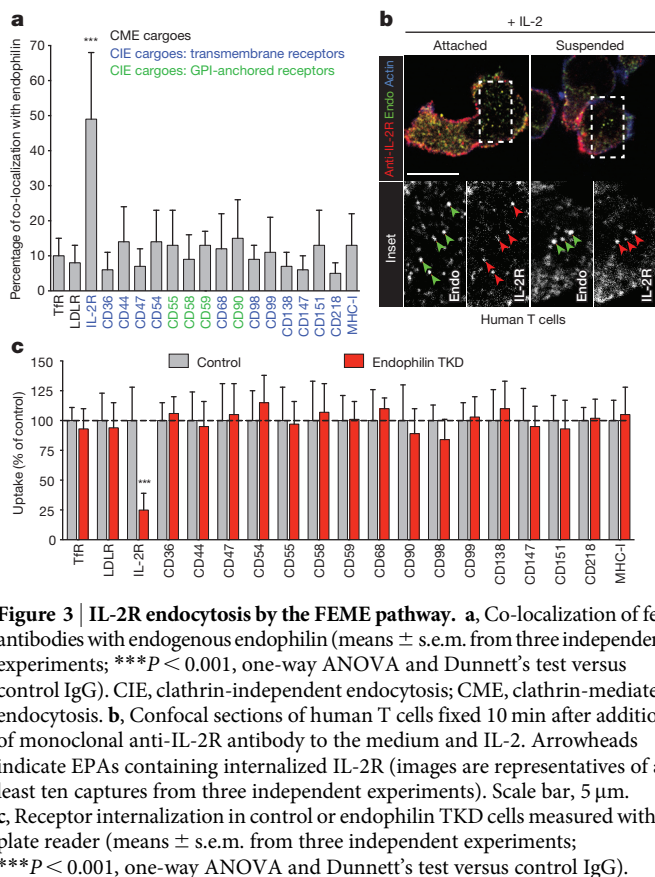
The very prompt budding of endocytic vesicles following receptor stimulation and the enrichment of endophilin at the leading edge suggests that FEME might be involved in directed cell migration. Similarly to EPA formation, migration of endophilin TKD cells was strongly decreased in an EGFR-dependent, but RAF- and MEK-independent, manner (Fig. 2h and Extended Data Fig. 7h), suggesting separate functions for FEME in MAPK signalling and cell migration downstream of EGFR. Finally, consistent with the decrease in NGFR uptake, neurite extension in response to NGF was strongly inhibited in endophilin TKD PC12 cells (Extended Data Fig. 7i–k), consolidating a role for FEME in growth-factor signalling and cell migration.

IL-2 receptor endocytosis by FEME

We next investigated which known clathrin-independent cargoes could use the FEME pathway to enter cells. The β -chain of the interleukin-2 receptor (IL-2R β) and the common cytokine γ -chain (IL-2R γ c) are known to use a clathrin-independent endocytic route^{24,25}. The IL-2 receptor (composed of the IL-2R α , β and γ c chains) assembles upon binding to IL-2, triggering a signal transduction cascade leading to lymphocyte proliferation and immune responses. After addition of 200 pM IL-2 together with an antibody specific to the extracellular domain of IL-2R, numerous EPAs containing internalized antibodies were observed in a human T-cell line (Fig. 3a, b). Upon addition of IL-2, endophilin puncta were observed at the edges of cells, followed by numerous internal EPAs (Extended Data Fig. 8a, b). However, we did not detect significant co-localization of endophilin with 16 transmembrane and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored receptors of the cluster of designation (CD) superfamily known to be internalized by clathrin-independent mechanisms²⁶ (Fig. 3a). Consistently, endophilin TKD only decreased the endocytic rate of IL-2R but not that of the other receptors (Fig. 3c). Together, this demonstrated that the FEME pathway mediates the uptake of IL-2-triggered IL-2R but that not all clathrin-independent cargo use this internalization pathway.

Inhibitors of the FEME pathway

Inhibition of clathrin-mediated endocytosis using five different genetic approaches (RNAi of key components or overexpression of dominant-negative mutants) did not interfere with EPA production upon stimulation (Fig. 4a), further confirming that the FEME pathway acts as a clathrin-independent endocytic route. However, we found that the different chemical means to inhibit clathrin-mediated endocytosis widely used in the literature (hypertonic shock, K⁺ depletion, monodansylcadaverine, chlorpromazine and phenylarsine oxide) all strongly inhibited EPA formation, suggesting pleiotropic effects of these inhibitors



and arguing against their specificity for clathrin-mediated endocytosis. Dynamin is probably the main driver of membrane scission in the FEME pathway, as overexpressing dominant-negative mutants K44A and T65A, depleting its levels by RNAi or inhibiting its function using five different small inhibitors including dynasore and dyngo-4a abrogated EPA budding (Fig. 4a and Extended Data Fig. 8c). Perturbing actin polymerization with cytochalasin D, latrunculin A, jasplakinolide or Arp2/3 inhibitors blocked EPA formation, even at a concentration that did not block clathrin-mediated endocytosis (Fig. 4b and Extended Data Figs 8f, g and 9a). Perturbation of Rho and of Rac blocked the pathway, consistent with their known inhibition of IL-2R β uptake^{24,27}. Surprisingly, inhibition of Cdc42 increased EPA formation (Fig. 4b,

Extended Data Fig. 8f and Supplementary Video 5). All known inhibitors of clathrin-independent endocytosis/macropinocytosis tested also inhibited the FEME pathway (Fig. 4c). However, overexpression of the BAR domain of endophilin lacking its N-terminal amphipathic helix (Δ H0-BAR) was a good inhibitor of the pathway (Fig. 4c, d and Extended Data Fig. 8d, e), suggesting a specific way to inhibit the pathway. It acts by heterodimerizing with endogenous endophilin, and thus decreasing its recruitment to the membrane. Interestingly, many inhibitors acted very promptly (seconds) on endophilin recruitment to the plasma membrane (Extended Data Fig. 8g). Key inhibitors of EPA formation also inhibited FEME cargo uptake but not transferrin uptake and perturbed directed cell migration (Extended Data Fig. 9a, b). Altogether, this established FEME as a clathrin-independent but dynamin-, cholesterol-, actin-, Rac-, Rho-, phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI(3)K)- and PAK1-dependent endocytic pathway.

PtdIns(3,4)P₂ is required for FEME

The prominence of endophilin signals at the leading edge of migrating cells (also called the lamellipodium) and its inhibition by class I PI(3)K inhibitors suggested a role for phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃), as it is produced from the phosphorylation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) by class I PI(3)K upon receptor activation and is enriched at the leading edge^{28,29}. Once generated, PtdIns(3,4,5)P₃ is rapidly hydrolysed back into PtdIns(4,5)P₂ by the 3'-phosphatase PTEN (Fig. 5a and ref. 30). As expected, genetic or chemical inhibition of PTEN significantly increased the recruitment of endophilin at the leading edge in a class I PI(3)K-dependent manner (Fig. 5b, c and Extended Data Fig. 9c). Surprisingly, inhibition of the 5'-phosphatases SHIP1 and SHIP2, that hydrolyse PtdIns(3,4,5)P₃ into PtdIns(3,4)P₂, strongly reduced the recruitment of endophilin at the leading edge (Fig. 5b, c and Extended Data Fig. 9c). As both the levels of PtdIns(3,4,5)P₃ and PtdIns(3,4)P₂ were elevated in PTEN-inhibited cells (ref. 32 and Extended Data Fig. 9e), but only those of PtdIns(3,4)P₂ were decreased in SHIP1 plus SHIP2-depleted cells, it indicated that PtdIns(3,4)P₂ was required for the recruitment of endophilin. This was confirmed by the unusual recruitment of endophilin onto endosomes/lysosomes in cells depleted for the 4'-phosphatases INPP4A and INPP4B (Extended Data Fig. 9f). INPP4A and INPP4B dephosphorylate PtdIns(3,4)P₂ into PtdIns(3)P at endosomes³³. We further established that PtdIns(3,4)P₂ produced from PtdIns(4)P by the class II PI(3)K C2 α (which is insensitive to class I PI(3)K inhibitors) was not involved in endophilin recruitment at the leading edge (Fig. 5b, c and Extended Data Fig. 9c), consistent with the recruitment of this kinase to clathrin-coated pits³⁴. Thus, we concluded that the formation of

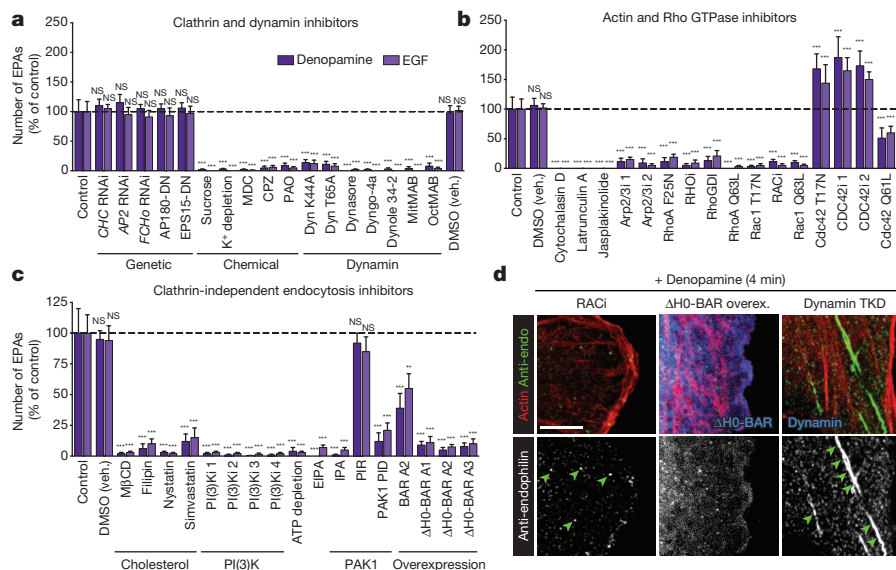


Figure 4 | Regulation of the FEME endocytic pathway. **a–c**, Quantification of the number of EPAs in cells pre-treated with the indicated genetic or chemical clathrin-mediated endocytosis and dynamin inhibitors (CPZ, chlorpromazine; MDC, monodansylcadaverine; PAO, phenylarsine oxide) (**a**), actin/Rho GTPase inhibitors (**b**) or clathrin-independent endocytosis inhibitors (EIPA, 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride; IPA, IPA-3; M β CD, methyl- β -cyclodextrin; PIR, PIR 3.5) (**c**) before stimulation with denopamine or EGF (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments; NS, non-significant; *** $P < 0.001$, one-way ANOVA and Dunnett's test versus control). **d**, Confocal sections of cells depleted for dynamin 1, 2 and 3 (TKD), overexpressing high levels of Δ H0-EndoBAR or treated with the EHT1864 (RACi) for 5 min before stimulation with denopamine, fixed and immunostained for endogenous endophilin and actin (images are representatives of at least ten captures). Scale bar, 5 μ m.

from distinct regions of the cells, on a different timescale to clathrin-mediated endocytosis (Extended Data Fig. 10j). We define the FEME pathway as the rapid formation (seconds in our cells) at the cell surface of tubulo-vesicular (<1 µm) carriers, positive for endophilin, that rapidly travel towards the cell centre promptly after stimulation of cargo receptors by their cognate ligands. Possibly, this will be extended to the growth cones and synapses in neurons where fast clathrin-independent endocytosis was reported^{14,15,39}.

Building an endocytic vesicle requires cargo recruitment adaptors, membrane curvature effectors and a membrane scission machinery⁴⁰. Endophilin has all these characteristics in one protein, thus explaining its central role in FEME carrier formation. Its SH3 domain binds to cargo receptors, its BAR domain induces membrane curvature, and by insertion of its multiple amphipathic helices, can support membrane scission⁴¹, aided by the recruitment of dynamin¹³. We show that, mechanistically, receptors need to be activated to become FEME cargoes, and that PtdIns(3,4)P₂, produced from the dephosphorylation of PtdIns(3,4,5)P₃ by SHIP phosphatases, mediates the engagement of lamellipodin, which in turn recruits endophilin at the plasma membrane.

The FEME pathway mediates the cellular entry of the well-established clathrin-independent cargoes^{24,42,43} cholera and shiga toxins (see accompanying paper⁴⁴) and IL-2R but not of the other cargoes tested. The variety of receptors entering by the FEME pathway suggests a role in many cellular functions and presents ample opportunity for viruses and other pathogens to exploit the pathway.

Online Content Methods, along with any additional Extended Data display items and Source Data, are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

Received 15 August; accepted 17 November 2014.

Published online 17 December 2014.

- Ringstad, N., Nemoto, Y. & De Camilli, P. The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 8569–8574 (1997).
- Guichet, A. *et al.* Essential role of endophilin A in synaptic vesicle budding at the *Drosophila* neuromuscular junction. *EMBO J.* **21**, 1661–1672 (2002).
- Verstreken, P. *et al.* Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell* **109**, 101–112 (2002).
- Schuske, K. R. *et al.* Endophilin is required for synaptic vesicle endocytosis by localizing synaptojanin. *Neuron* **40**, 749–762 (2003).
- Milosevic, I. *et al.* Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron* **72**, 587–601 (2011).
- Ringstad, N. *et al.* Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* **24**, 143–154 (1999).
- Gad, H. *et al.* Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* **27**, 301–312 (2000).
- Andersson, F., Low, P. & Brodin, L. Selective perturbation of the BAR domain of endophilin impairs synaptic vesicle endocytosis. *Synapse* **64**, 556–560 (2010).
- Sundborger, A. *et al.* An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J. Cell Sci.* **124**, 133–143 (2011).
- Perera, R. M., Zoncu, R., Lucast, L., De Camilli, P. & Toomre, D. Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 19332–19337 (2006).
- Ferguson, S. M. *et al.* Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev. Cell* **17**, 811–822 (2009).
- Taylor, M. J., Perrais, D. & Merrifield, C. J. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol.* **9**, e1000604 (2011).
- Meinecke, M. *et al.* Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *J. Biol. Chem.* **288**, 6651–6661 (2013).
- Jockusch, W. J., Praefcke, G. J., McMahon, H. T. & Lagnado, L. Clathrin-dependent and clathrin-independent retrieval of synaptic vesicles in retinal bipolar cells. *Neuron* **46**, 869–878 (2005).
- Llobet, A. *et al.* Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *J. Neurosci.* **31**, 8512–8519 (2011).
- Tang, Y. *et al.* Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel binding partners for the beta1-adrenergic receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 12559–12564 (1999).
- Petrelli, A. *et al.* The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* **416**, 187–190 (2002).
- Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y. & Dikic, I. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* **416**, 183–187 (2002).
- Cremona, O. *et al.* Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**, 179–188 (1999).
- Parton, R. G. & del Pozo, M. A. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 98–112 (2013).
- Glebov, O. O., Bright, N. A. & Nichols, B. J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature Cell Biol.* **8**, 46–54 (2006).
- Lundmark, R. *et al.* The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr. Biol.* **18**, 1802–1808 (2008).
- Sigismund, S. *et al.* Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev. Cell* **15**, 209–219 (2008).
- Lamaze, C. *et al.* Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell* **7**, 661–671 (2001).
- Sauvonnnet, N., Dujancourt, A. & Dautry-Varsat, A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gamma cytokine receptor. *J. Cell Biol.* **168**, 155–163 (2005).
- Maldonado-Báez, L., Williamson, C. & Donaldson, J. G. Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view. *Exp. Cell Res.* **319**, 2759–2769 (2013).
- Grassart, A., Dujancourt, A., Lazarow, P. B., Dautry-Varsat, A. & Sauvonnnet, N. Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO Rep.* **9**, 356–362 (2008).
- Fritsch, R. & Downward, J. SnapShot: Class I PI3K isoform signaling. *Cell* **154**, 940 (2013).
- Servant, G. *et al.* Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* **287**, 1037–1040 (2000).
- Song, M. S., Salmena, L. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 283–296 (2012).
- Xie, J., Erneux, C. & Pirson, I. How does SHIP1/2 balance PtdIns(3,4)P₂ and does it signal independently of its phosphatase activity? *Bioessays* **35**, 733–743 (2013).
- Batty, I. H. *et al.* The control of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate concentrations by activation of the Src homology 2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase 2, SHIP2. *Biochem. J.* **407**, 255–266 (2007).
- Gewinner, C. *et al.* Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer Cell* **16**, 115–125 (2009).
- Posor, Y. *et al.* Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature* **499**, 233–237 (2013).
- Yoon, Y., Zhang, X. & Cho, W. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) specifically induces membrane penetration and deformation by Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domains. *J. Biol. Chem.* **287**, 34078–34090 (2012).
- Krause, M. *et al.* Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev. Cell* **7**, 571–583 (2004).
- Vehlow, A. *et al.* Endophilin, Lamellipodin, and Mena cooperate to regulate F-actin-dependent EGF-receptor endocytosis. *EMBO J.* **32**, 2722–2734 (2013).
- Kononenko, N. L. *et al.* 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 (2014).
- Watanabe, S. *et al.* Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* **504**, 242–247 (2013).
- McMahon, H. T. & Boucrot, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 517–533 (2011).
- Boucrot, E. *et al.* Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell* **149**, 124–136 (2012).
- Römer, W. *et al.* Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* **450**, 670–675 (2007).
- Ewers, H. *et al.* GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nature Cell Biol.* **12**, 11–18 (2010).
- Renard, H.-F. *et al.* Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature* <http://dx.doi.org/10.1038/nature14064> (2014).

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements We thank S. Y. Peak-Chew for mass spectrometry, M. Edwards and K. McGourty for technical help and P. De Camilli, T. Kirchhausen, G. B. Hammond, P. Robinson, M. Robinson, M. McNiven, B. Nichols, A. Benmerah, M. Krause and Genentech for the gift of reagents, and the members of the McMahon and Boucrot laboratories for comments. The research was funded by the Medical Research Council UK (grant number U105178805) (H.T.M., L.A.-S., G.H., Y.V. and E.B. in part) and a Royal Society grant (research grant number RG120481) (E.B.). A.P.A.F. is supported by the Fundação para a Ciência e Tecnologia, L.A.-S. is a EMBO Long Term fellow and is supported by Marie Curie Actions, and E.B. is a Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) David Phillips Research Fellow.

Author Contributions H.T.M. and E.B. designed the research and supervised the project. H.T.M. and A.P.A.F. performed pull-down experiments. L.A.-S., A.P.A.F. and S.D. did the signalling experiments. L.A.-S. did the super-resolution imaging. A.P.A.F. did the cell migration experiments. S.D. performed the plasma membrane isolations; Y.V. performed the PC12 cell experiments. G.H. prepared and acquired the electron-microscopy data. L.B. and N.S. provided critical reagents. E.B. performed and analysed all the other experiments. E.B. and H.T.M. wrote the manuscript with input from all the other authors.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.T.M. (hmm@mrc-lmb.cam.ac.uk) or E.B. (e.boucrot@ucl.ac.uk).

METHODS

Cell culture. BSC1 (ECACC 85011422) and HEK293 cells (ATCC CRL-1573) were cultured in DMEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gold PAA), 1 mM GlutaMAX-I (Gibco). Normal human epithelial cells hTERT-RPE1 (ATCC CRL-4000) were cultured in DMEM:F12 HAM (1:1 v/v) (Sigma), 0.25% sodium bicarbonate (w/v) (Sigma), 1 mM GlutaMAX-I (Gibco) and 10% FBS (Gold, PAA). Human dermal primary fibroblasts from adult donors (hDFA; ATCC PCS-201-012) were maintained in DMEM:F12 HAM (1:1 v/v) (Sigma), 2% FBS, 1 mM GlutaMAX-I, 0.8 μ M insulin, 1 μ g ml⁻¹ hydrocortisone, 50 μ g ml⁻¹ ascorbic acid (Sigma) and 5 ng ml⁻¹ bFGF (R&D). hDFA were used within 15–20 population doublings *in vitro* to ensure a minimum percentage of senescent cells within the cell population. Human T cells Kit255 (expressing endogenous IL-2R) were cultured in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 10% FBS, 1 mM GlutaMAX-I and 200 pM IL-2. Rat PC12 neuroendocrine cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 7.5% FBS and 7.5% heat inactivated horse serum and 1 mM GlutaMAX-I. BSC1 cells stably expressing σ 2-EGFP were a gift from T. Kirchhausen (Harvard Medical School, USA) and were cultured as parental BSC1 cells with the additional of 200 μ g ml⁻¹ G418. Approximately 2×10^6 , 2×10^5 , 2.5×10^4 or 5×10^3 cells were seeded on 100 mm, 35 mm dishes, 13 mm coverslips or 96-well glass bottom plates, respectively. Cells were regularly tested for mycoplasma contamination.

Gene cloning. N-BAR, Δ helix0 BAR, Δ SH3, Δ N-BAR, SH3 domains or full-length endophilin-A1 (SH3GL2, FLJ 92732), -A2 (SH3GL1, IMAGE 3458016) and -A3 iso 1 (SH3GL3, IMAGE 5197246) genes were cloned into pDONR201 (Invitrogen) and transferred into pEGFP, pTagRFP-T⁴⁵ (called 'RFP' elsewhere), pTagBFP (called 'BFP' elsewhere) or pGEX-6P2 vectors converted into the Gateway system (pDEST vectors). Mouse β_1 adrenergic receptor (ADRB1, IMAGE 905582) full length, third intracellular loop (TIL, amino acids (aa) 246–315) and C terminus (C-term, aa 370–end), human β_2 adrenergic receptor (ADRB2, IMAGE 5217922) full length, TIL (aa 220–274) and C-term (aa 330–end), human β_3 adrenergic receptor (ADRB3, IMAGE 30915407) TIL (aa 225–294) and C-term (aa 350–end), human α_{2a} adrenergic receptor (ADRA2A, IMAGE 6198830) full length, TIL (aa 218–374), human α_{2b} adrenergic receptor (ADRA2B, IMAGE 9020527) full length, TIL (aa 194–372), human dopamine receptor 1 (DRD1, IMAGE 30915297) full length, TIL (aa 219–272) and C-term (aa 338–end), human dopamine receptor 2 (DRD2, IMAGE 3939741) full length, human dopamine receptor 3 (DRD3, IMAGE 40112299) full length, TIL (aa 210–329), mouse dopamine receptor 4 (DRD4, IMAGE 6492837) full length, TIL (aa 309–314), human dopamine receptor 5 (DRD5, IMAGE 3928370) full length, TIL (aa 247–296) and C-term (aa 361–end), human serotonin receptor 6 (HTR6, IMAGE 30915608) TIL (aa 209–265) and C-term (aa 321–end), human serotonin receptor 7 (HTR7, IMAGE 5297325) TIL (aa 258–325) and C-term (aa 389–end), human muscarinic acetylcholine receptor M1 (CHRM1, IMAGE 4931283) full length, TIL (aa 210–366), human muscarinic acetylcholine receptor M2 (CHRM2, IMAGE 40017105) full length, TIL (aa 208–388), human muscarinic acetylcholine receptor M4 (CHRM4, IMAGE 9021535) full length, TIL (aa 217–401), human histamine receptor 1 (HRH1, IMAGE 30340368) TIL (aa 211–418) and human histamine receptor 3 (HRH3, IMAGE 6971899) TIL (aa 218–359), human CIN85 (SH3BP1, IMAGE 3906722) SH3(3) (aa 1–328), PRD (aa 327–428), and PCC (aa 327–end), human Cbl-PRD (aa 477–end), human RhoGDI (ARHGDIA, IMAGE 4867857), rat β -arrestin 1 and 2 full length, human ALIX (PDCD6IP, IMAGE 4340998) PRD domain (aa 717–end) and human PAK1 (PAK1, Addgene 23543) PAK1-inhibitory domain PID (aa 89–149) were cloned into pDONR201 and transferred into pEGFP DEST vectors.

Double-tagged HA- β 1AR-EGFP, HA- β 2AR-EGFP, HA- α_{2a} AR-EGFP, HA- α_{2b} AR-EGFP, HA-DR1-EGFP, HA-DR2-EGFP, HA-DR3-EGFP, HA-DR4-EGFP, HA-DR5-EGFP, HA-mAChR1-EGFP, HA-mAChR2-EGFP, HA-mAChR4-EGFP plasmids were cloned by inserting a HA tag at the N terminus (thus at the extracellular extremity) into the pDONR201 clones containing full-length receptors described above and then transferred into a pEGFP-C DEST vector. Point mutations β_1 -AR R271A, P272/273A, R285A, P283/284A, P272/273/283/284A and R298/299A; DR3 K293E and R318E; DR4 P230/233A, R3236D R237E, R276E; and mAChR4 R230E, K255/256E and P331E were introduced by site-directed mutagenesis in the entry or expression clones containing the TIL of the respective receptors. Alix R757E (ref. 46) was introduced into the PRD clone. Human RhoA F25N, Rac1 T17N, Cdc42 T17N, Rac1 Q61L, RhoA Q63L and Cdc42 Q61L mutants were cloned into pEGFP-expressing vectors. Rat EGFP-LCa (clathrin light chain a) was provided by M. Robinson, rat dynamin 2-EGFP and K44A variant were gifts of M. McNiven, rat EGFP-synaptotagmin 1 (145 and 170 isoforms) and Flag-synaptotagmin 2 (isoform 1) were gifts of P. De Camilli; synaptotagmin 1 D730A (5'-phosphatase mutant¹⁰) was introduced by quickchange mutagenesis. EGFP-Flotillin-1 was provided by B. Nichols, EGFP-Eps15 A95/295 (called 'Eps15-DN' here) was a gift from A. Benmerah and EGFP-lamellipodin was a gift from M. Krause, the APH domain version of lamellipodin was generated by quickchange mutagenesis. GRAF1-EGFP²²,

EGFP-AP180 C terminus (residues 530–915, called 'AP180-DN' here)⁴⁷, dynamin1 T65A⁴⁸ and FCHO2-EGFP⁴⁹ have been described earlier.

Gene transfection. For live-cell imaging localization experiments, cells seeded on 35 mm glass bottom dishes (MatTek) were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or Nanofectin (PAA) and 50–250 ng DNA (the levels of each plasmid were titrated down to levels allowing good detection but limiting side effects of overexpression). For dominant-negative mutants, 1 μ g of plasmids were used. For endogenous staining on fixed samples, cells seeded on 13 mm coverslips (placed in 24-well plates) were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or Nanofectin (PAA) and 0.5–50 ng DNA depending on the plasmids and the experiments (low or high overexpression). For receptor tails extracts, cells seeded on 100 mm dishes were transfected using Nanofectin (PAA) and 1–3 μ g DNA. Cells were incubated 24 h to express the constructs and were either imaged live, fixed (3.7% paraformaldehyde, 20 min) or processed to prepare the cell extracts.

siRNA suppression of gene expression. The following siRNA used were: endophilin A1 + 2 + 3 pool 1: Invitrogen Stealth HSS109710, HSS109705 and HSS109713 (targeting human SH3GL2, SH3GL1 and SH3GL3, respectively); endophilin A1 + 2 + 3 pool 2: Invitrogen Stealth HSS109708, HSS109706 and HSS109711 (targeting human SH3GL2, SH3GL1 and SH3GL3, respectively); endophilin A1 + 2 + 3 pool 3: Invitrogen Stealth HSS109709, HSS109707, HSS109712 (targeting human SH3GL2, SH3GL1 and SH3GL3, respectively); endophilin B1 and B2: Dharmacon D-015810-01 and D-015810-02 (targeting human SH3GLB1 and SH3GLB2, respectively); rat EndoA1 + 2 + 3 pool (PC12 cell experiments): 3 oligos against A1 (SH3GL2) RSS300636, RSS350431 and RSS350432, 3 oligos against A2 (SH3GL1) RSS330960, RSS360961 and RSS372917, 3 oligos against A3 (SH3GL3) RSS330957, RSS330958 and RSS330959; clathrin heavy chain CHC: Invitrogen Stealth HSS174637; AP2: mu2-2 defined in ref. 50 or Invitrogen Stealth HSS101955 (targeting human AP2M1); β -arrestin 1 and 2: Thermo Scientific L-011971 and L-007292 (targeting human ARRB1 and ARRB2, respectively), Cbl: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-003003-09, J-003003-10, J-003003-11 and J-003003-12 targeting human CBL); CIN85: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-014748-08, J-014748-07, J-014748-06 and J-014748-05 targeting human SH3KBP1); dynamin 1: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-003940-05, J-003940-06, J-003940-07 and J-003940-08 targeting human DNM1); dynamin 2: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-004007-05, J-004007-06, J-004007-07 and J-004007-08 targeting human DNM2); dynamin 3: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-013931-05, J-013931-06, J-013931-07 and J-013931-08 targeting human DNM3); lamellipodin: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-031919-08, J-031919-07, J-031919-06 and J-031919-05 targeting human RAPH1); SHIP1: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-003013-09, J-003013-10, J-003013-11 and J-003013-12 targeting human INPP5D); SHIP2: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-004152-06, J-004152-07, J-004152-08 and J-004152-09 targeting human INPPL1); PTEN: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-003023-09, J-003023-10, J-003023-11 and J-003023-12 targeting human PTEN); PI3K-C2 α : Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-006771-08, J-006771-07, J-006771-06 and J-006771-05 targeting human PI3K2CA); INPP4A: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-011299-06, J-011299-07, J-011299-08 and J-011299-09 targeting human INPP4A); INPP4B: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-011539-17, J-011539-18, J-011539-19 and J-011539-08 targeting human INPP4B); synaptotagmin 1: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-019486-07, J-019486-08, J-019486-09 and J-019486-10 targeting human SYNJ1); synaptotagmin 2: Dharmacon ON-TARGETplus SMARTpool (mix of J-019486-07, J-019486-08, J-019486-09 and J-019486-10 targeting human SYNJ2). Control siRNA used were Dharmacon ON-TARGETplus GAPDH control (D-001830-01-05), Invitrogen Stealth control (scrambled) oligo 138782 or a mixture of Invitrogen Stealth 'high GC' 45-2000 and 'low GC' 45-2002 oligos.

Cells seeded on 35 mm dishes were transfected twice (on day 1 and 2) with Oligofectamine (Invitrogen) complexed with 80 pmol of each indicated siRNA and analysed 3–4 days after the first transfection. Rescue experiments were performed with plasmid DNA transfection of the indicated constructs at the middle of day 3 (when endogenous levels of the targeted proteins were already decreased) and the cells were analysed 16 h later (on day 4). Transfection of siRNA into human T cells Kit255 was performed by electroporation using a Nucleofector 2b (Lonza) and Ingenio (Mirus Bio) cuvettes and electroporation solutions. RNAi knockdown efficiency was verified by western blotting and immunofluorescence counter staining, when antibodies were available. The use of validated pools of siRNA targeting the same genes increased the knock-down efficiency and specificity.

Protein purification and pull-down experiments. GST-tagged constructs were expressed in BL21 *Escherichia coli* (Stratagene). Cells were lysed using an Emulsiflex C3, spun at 140,000g for 40 min at 4 °C in a Beckman Ti45 rotor, and the supernatant was bound to glutathione beads for 30 min. The beads were washed extensively with 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.4, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, including

2 washes with 500 mM NaCl. GST-proteins were eluted from the GST-sepharose beads with 10 mM glutathione, further purified by Superdex 200 gel filtration, and rebound to a minimal volume of fresh GST-sepharose beads (to achieve saturation) for use in pull downs. HEK293 cells expressing various EGFP-tagged constructs were quickly washed with cold PBS, lysed in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM DTT, 0.1% Triton X-100 and a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific)), briefly sonicated and spun at 14,000g for 10 min. Bead-bound proteins were then exposed to cell lysates for 1 h, pelleted in a cooled bench-top centrifuge, and washed three times in lysis buffer. The final pellet was boiled in sample buffer and run on SDS-PAGE ('input' lanes correspond to 10% of cell extract). The proteins were transferred onto PVDF membrane and immunoblotted using anti-EGFP antibodies.

Antibodies. The following antibodies were used for immunostaining, flow cytometry or immunoblotting: pan anti-endophilin Ra74 (in-house affinity purified rabbit polyclonal raised against the SH3 domain of rat endophilin A1¹⁵), anti-endophilin A2 clones H-60 and A-11 (rabbit polyclonal sc-25495 and mouse monoclonal sc-365704, respectively, Santa Cruz Biotechnology), anti-EGFR antibody clone D38B1 used for total staining (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 4267), anti- α -adaptin clone 8 (mouse monoclonal, BD Bioscience 610501) and clone AP6 (mouse monoclonal, Thermo Scientific MA1-064), anti-clathrin heavy chain X22 (Thermo Scientific MA1-065), anti-vinculin clone hVIN-1 (mouse monoclonal, Sigma V9264), anti-Arp3 (rabbit polyclonal, Millipore 07-277), anti-cortactin p80/85 clone 4F11 (mouse monoclonal, Millipore 05-180), anti-dynamin clone 41 (mouse monoclonal, BD Transduction Laboratories 610245), anti-caveolin-1 (mouse monoclonal, BD Transduction Laboratories 610059), anti-lamellipodin (mouse monoclonal clone H-5, Santa Cruz sc-390050 and rabbit polyclonal Atlas Antibodies HPA020027), anti-SHIP1 clone D1163 (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 2728), anti-SHIP2 clone C76A7 (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 2839), anti-synaptojanin (rabbit polyclonal, Abcam 84309), anti-LAMP-1 clone H4A3 (Developmental Studies Hybridoma Bank), anti-calnexin H60 (rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology sc-11397), anti-integrin β 1 (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 4706), anti- β -AR (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 12271), anti- β -arrestin1/2 (goat polyclonal, Abcam 31294), anti-phosphorylated p44/42 MAPK T202/Y204 (phosphorylated Erk1/2) clone D13.14.4E (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 4370), anti-p44/42 MAPK (total Erk1/2) (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 9102), anti-phosphorylated Elk1 (Ser 383) (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 9181), anti-phosphorylated cJun (Ser 73) clone D47G9 (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 3270), anti-phosphorylated CREB (Ser 133) clone 87G3 (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 9198), anti-PtdIns(3,4)₂P₂ (mouse monoclonal, Echelon Bioscience Z-P034b), anti-PtdIns(4,5)P₂ (mouse monoclonal, Echelon Bioscience Z-A045), anti-PtdIns(3,4,5)P₃ (mouse monoclonal, Echelon Bioscience Z-P345b), anti- β -tubulin clone 9F3 (mouse monoclonal, Cell Signaling Technologies 2128), anti-EGFP ab290 (rabbit polyclonal, AbCam 290), anti-Myc tag clone 9E10 (mouse monoclonal, AbGent AM1007a) and clone 9B11 (mouse monoclonal, Cell Signaling Technologies 2276), anti-Flag tag clone M2 (mouse monoclonal, Sigma F1804 and rabbit polyclonal Cell Signaling Technologies 2368), anti-GAPDH clone 0411 (mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology sc-47724) and clone 14C10 (rabbit polyclonal, Cell Signaling Technologies 2118).

The following antibodies were used for receptor uptake assays ('antibody feeding assays'): anti-HA clone 16B12 used for 'HA-GPCR-EGFP' chimera uptake assays (mouse monoclonal Covance), anti-EGFR antibody clone 13A9 (mouse monoclonal raised against the ectodomain of EGFR that does not compete with EGF binding, a gift from Genentech), anti-IL-2R clone 561 (mouse monoclonal, recognizing the extracellular portion of IL-2R but does not compete with IL-2 (ref. 51)), anti-NGFR antibody clone 165131 (mouse monoclonal raised against the ectodomain of TrkA, R&D systems MAB2148), anti-TfR clone CBL47 (rabbit polyclonal, Millipore CBL47), anti-LDLR (mouse monoclonal, R&D systems MAB2148), anti-CD36 clone 5-271 (mouse monoclonal, BioLegend 336202), anti-CD44 clone BJ18 (mouse monoclonal, BioLegend 338802), anti-CD47 clone CC2C6 (mouse monoclonal, BioLegend 323102), anti-CD54 (also called ICAM-1) clone HA58 (mouse monoclonal, BioLegend 353101), anti-CD55 clone JS11 (mouse monoclonal, BioLegend 311302), anti-CD58 clone LFA-3 (mouse monoclonal, BioLegend 330902), anti-CD59 clone H19 (mouse monoclonal, BioLegend 304702), anti-CD68 clone Y82A (mouse monoclonal, BioLegend 333801), anti-CD90 (Thy1) clone IBL-6/23 (rat monoclonal, AbCam ab3105), anti-CD98 clone MEM-108 (mouse monoclonal, BioLegend 315602), anti-CD99 clone TU12 (mouse monoclonal, BD Pharmingen 555687), anti-CD138 clone MI15 (mouse monoclonal, BioLegend 356501), anti-CD147 clone HIM6 (mouse monoclonal, BioLegend 306202), anti-CD151 (mouse monoclonal, ABD Serotec MCA1856T), anti-CD218a clone H44 (mouse monoclonal, BioLegend 313804) and anti-MHC-I HLA-A,B,C clone W6/32 (mouse monoclonal, BioLegend 311402).

Primary antibodies were used at 0.2–5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for immunoblotting, 0.1–10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for immunofluorescence and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for antibody feeding assays. Before immunostaining, fixed cells were permeabilized with 0.05% saponin, apart from staining of activated transcription factors (CREB, Elk1 and Jun) which was done after permeabilization with 0.1% Triton X-100 and for phosphoinositide staining which was done as described below.

The following secondary antibodies were used: Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG, Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG and Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit (all from Life Technologies) and goat anti-mouse IgG-HRP conjugate and goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate (both from Bio-Rad).

Chemicals, growth factors and small inhibitors. Pre-treatments with small inhibitors before stimulation were performed for 5 min at 37 °C, unless specified otherwise, and the inhibitors were kept during the stimulation or assay periods in all cases. Cytochalasin D (actin depolymerizer, Tocris 1233, used at 100 nM), latrunculin A (actin depolymerizer, Tocris 3973, used at 200 nM), jasplakinolide (actin stabilizer, Tocris 2792, used at 100 nM), rhosin (RhoA inhibitor called 'RHOi' in this study, Calbiochem 555460, used at 10 μM), EHT1864 (RAC inhibitor, called 'RACi 1' in this study, Tocris 3872, used at 2 μM), EHOP-016 (RAC inhibitor, called 'RACi 2' in this study, Sigma SML0526, used at 2 μM), secramine⁵² (Cdc42 inhibitor, called 'CDC42i 1' in this study, a gift from T. Kirchhausen (Harvard Medical School) and the Hammond lab (Univ. of Louisville) was synthesized by B. Xu and G. B. Hammond, and was used at 10 μM), ML141 (Cdc42 allosteric inhibitor, called 'CDC42i 2' in this study, Tocris 4266, used at 10 μM), CK548 (Arp2/3 inhibitor, called 'Arp2/3i 1' in this study, Sigma C7499, used at 50 μM), CK636 (Arp2/3 inhibitor, called 'Arp2/3i 2' in this study, Sigma C7374, used at 50 μM), methyl- β -cyclodextrin (extracts cholesterol, called 'M β CD' in this study, Sigma 332615, used at 50 μM for three incubations of 10 min each), filipin (sequesters cholesterol, Sigma F4767, used at 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$), nystatin (sequesters cholesterol, Sigma N3503, used at 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), simvastatin (sequesters cholesterol, Sigma S6196, used at 10 μM), dynasore (dynamin inhibitor⁵³, a gift of T. Kirchhausen (Harvard Medical School) and used at 80 μM), Dyngo-4a (dynamin inhibitor⁵⁴, a gift of P. Robinson (Univ. of Sydney) and used at 20 μM), dynole 34-2 (dynamin inhibitor⁵⁵, Tocris 4222, used at 20 μM), MitMAB (dynamin inhibitor⁵⁶, Calbiochem 324411, used at 20 μM), OctMAB (dynamin inhibitor⁵⁶, Tocris 4225, used at 20 μM), monodansylcadaverine (clathrin-mediated endocytosis inhibitor⁵⁷, called 'MDC' in this study, Sigma D4008, used at 100 μM), chlorpromazine (clathrin-mediated endocytosis inhibitor⁵⁸, called 'CPZ' in this study, Sigma C8138, used at 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), phenylarsine oxide PAO (clathrin-mediated endocytosis inhibitor⁵⁹, Sigma P3075, used at 10 μM), GDC-0941 (broad and specific PI(3)K inhibitor, called 'PI(3)Ki 1' or 'PI(3)Ki' in this study, Symansis SYGDC0941, used at 50 nM), GSK2126458 (broad and specific PI(3)K inhibitor, called 'PI(3)Ki 2' in this study, BioVision 1961, used at 25 nM), LY294002 (broad PI(3)K inhibitor, called 'PI(3)Ki 3' in this study, Tocris 1130, used at 50 μM), wortmannin (broad PI(3)K inhibitor, called 'PI(3)Ki 4' in this study, Cell Signaling Technologies 9951, used at 500 nM), A66 S (PI(3)K p110 α specific inhibitor, Selleckchem S2636, used at 50 nM), TGX-221 (PI(3)K p110 β specific inhibitor, Cayman 10007349, used at 25 nM), CAL-101 (PI(3)K p110 δ specific inhibitor, Selleckchem S2226, used at 50 nM), AS-252424 (PI(3)K p110 γ specific inhibitor, Cayman 10009052, used at 100 nM), 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (macropinocytosis inhibitor, called 'EIPA' in this study, Sigma A3085, used at 25 μM), PF-3758309 (broad PAK inhibitor, called 'PAKi' in this study, Calbiochem 500613, used at 1 μM), IPA-3 (PAK1 inhibitor, called 'IPA' in this study, Sigma I2285, used at 20 μM) and PIR 3.5 (IPA-3 inactive analogue, called 'PIR' in this study, Tocris 4212, used at 20 μM), AS 19499490 (SHIP2 inhibitor, called 'SHIP2i' in this study, Tocris 3718, used at 1 μM), bpV(Hop) (protein tyrosine phosphatase inhibitor with selectivity for PTEN (IC₅₀ = 14 nM), called 'PTENi 1' in this study, Cayman 14433, used at 200 nM), bpV(Phen) (protein tyrosine phosphatase inhibitor with selectivity for PTEN (IC₅₀ = 38 nM), called 'PTENi 2' in this study, Santa Cruz Biotechnology sc-221378, used at 200 nM), SF1670 (PTEN inhibitor, called 'PTENi 3' in this study, Cayman 15368, used at 10 μM), PD153035 (EGFR inhibitor, called 'EGFRi' in this study, Tocris 1037, used at 5 μM), SB590885 (RAF inhibitor, called 'RAFi' in this study, Tocris 2650, used at 5 μM), PD032591 (MEK inhibitor, called 'MEKi 1' in this study, Tocris 4192, used at 0.5 mM), U0126 (MEK inhibitor, called 'MEKi 2' in this study, Cell Signaling Technologies 99035, used at 10 mM). Sucrose hypertonic treatment (inhibiting clathrin-mediated endocytosis⁶⁰) was performed by incubating cells at 37 °C with a 0.45 M sucrose solution; potassium (K⁺) depletion (inhibiting clathrin-mediated endocytosis⁶¹), was performed by washing the cells (all at 37 °C) with PBS twice, followed by 5 min with hypotonic PBS (1:3 v/v with water), and five quick washes followed by 10 min incubation in K⁺-depletion solution (150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 2 mM HEPES pH 7.4, 0.5% DMSO, 0.5% BSA). Cellular ATP depletion was performed as in ref. 42 by washing cells twice followed by incubation for 30 min at 37 °C in 10 mM

2-deoxy-D-glucose, 10 mM Na₃, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ in PBS. Control sample was prepared in 5 mM glucose, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ in PBS.

The following agonists, antagonists and growth factors were used: denopamine (β_1 -AR selective agonist, Sigma D7815), isoproterenol (non-selective β -AR agonist, Sigma I5627), noradrenaline (β_1 -AR agonist, Sigma, A7257), dobutamine (β_1 -AR partial agonist, Sigma, D0676), terbutaline (β_2 -AR selective agonist, Sigma, T2528), atenolol (β_1 -AR selective antagonist, Sigma A7655), betaxolol (β_1 -AR selective antagonist, Sigma B5683), butoxamine (β_2 -AR selective antagonist, Sigma B1385), clonidine (α_2 -AR selective agonist, Sigma C7897), dexmedetomidine (α_2 -AR selective agonist, Tocris 2749), dopamine (dopamine receptor agonist, Sigma H8502), quinpirole (dopamine receptor 2 agonist, Sigma Q102), (+)-PD128907 (dopamine receptor 3 selective agonist, Tocris 1243), PD168077 (dopamine receptor 4 selective agonist, Tocris 1065), acetylcholine (muscarinic acetylcholine receptor agonist, Sigma A6625), VU152100 (muscarinic acetylcholine receptor 4 selective agonist, Tocris 3383), epidermal growth factor (EGF, Sigma E9644), Alexa Fluor 555-EGF (Life Technologies E35350), hepatocyte growth factor (HGF, Calbiochem 375228), fibroblast growth factor (FGF, Calbiochem 341591), vascular endothelial growth factor (VEGF, Calbiochem 676473), platelet-derived growth factor (PDGF, Calbiochem 521215), insulin-like growth factor 1 (IGF-1, Calbiochem 407251), transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1 , Sigma T5050), bone morphogenetic protein 2 (BMP2, Cell Signaling Technologies 4697), nerve growth factor (NGF 2.5S, Invitrogen 13257-019), holo-transferrin (Sigma T0665), Alexa Fluor 488-Transferrin (Life Technologies T13342), Alexa Fluor 546-Transferrin (Life Technologies T23364), Alexa Fluor 633-Transferrin (Life Technologies T23362) and DiL-low density lipoprotein (DiL-LDL, Life Technologies L3482). Growth factors were labelled with Alexa-555 using a protein labelling kit (Life Technologies A37571), according to the instructions from the manufacturer.

Cell stimulation and cargo uptake. Cells were never serum-starved before stimulation and the ligand and antibodies were never pre-incubated with the cells at 4 °C. 'Resting' conditions correspond to cells being cultured in 10% serum media and directly fixed. '+ Serum' stimulation corresponds to the addition of 10% serum to regular culture media (final 20% serum concentration). Specific stimulations were performed as follow. HA-EGFP double tagged GPCRs: cells expressing HA-EGFP double-tagged GPCRs were stimulated at 37 °C, 5% CO₂ for 10 min in the presence of 10 μ g ml⁻¹ of anti-HA clone 16B12 monoclonal antibody and 10 μ M of the ligands denopamine (HA- β_1 AR-EGFP), isoproterenol (HA- β_2 AR-EGFP), clonidine (HA- α_{2A} AR-EGFP and HA- α_{2B} AR-EGFP), dopamine (HA-DR1-EGFP and HA-DR5-EGFP), quinpirole (HA-DR2-EGFP), (+)-PD128907 (HA-DR3-EGFP), PD168077 (HA-DR4-EGFP), acetylcholine (HA-muR1-EGFP and HA-muR2-EGFP) or VU152100 (HA-muR4-EGFP). For microscopy experiments, cells expressing HA- β_1 -AR-EGFP were incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 4 min with 10 μ g ml⁻¹ anti-HA clone 16B12 monoclonal antibody and 10 μ M denopamine. Adrenergic agonists and antagonists: cells were incubated at 37 °C for 4 min with 10 μ M or a titrating range (10⁻⁸ to 10⁻⁵ M) of concentration of denopamine, isoproterenol, noradrenaline, dobutamine or terbutaline. In some experiments, cells were incubated with 10 μ M atenolol, betaxolol, butoxamine 37 °C for 5 min before stimulation with isoproterenol. Growth factors: cells were incubated at 37 °C for 4 min with pre-warmed serum-free media containing 10 ng ml⁻¹ of EGF, HGF, FGF, VEGF, PDGF, IGF-1 or NGF or 50 ng ml⁻¹ BMP2 or 5 ng ml⁻¹ TGF- β_1 or 50 ng ml⁻¹ Alexa Fluor 555-conjugated EGF, HGF, FGF, VEGF or IGF-1. In some experiments, EGF was titrated from 2 to 500 ng ml⁻¹. Anti-EGFR antibody feeding assays were performed by directly incubating cells with pre-warmed serum-free media containing 0.5 μ g ml⁻¹ of anti-EGFR clone 13A9 monoclonal antibody and 50 ng ml⁻¹ of the indicated growth factors or 10 μ M denopamine for 4 min at 37 °C. Interleukin-2: human T cells Kit255 were incubated at 37 °C with pre-warmed serum-free media containing either 200 pM IL-2 or 10 μ g ml⁻¹ anti-IL-2R clone 561 antibody and 200 pM IL-2 for the indicated time. Clathrin-independent cargoes: cells were incubated at 37 °C for 15 min with pre-warmed serum-free media containing 10 μ g ml⁻¹ of the indicated anti-CD proteins or MHC-I antibodies detecting the extracellular portion of the receptors. Clathrin-dependent cargoes: cells were incubated at 37 °C for 7 min with pre-warmed serum-free media containing 20 μ g ml⁻¹ Alexa Fluor-488-labelled human transferrin or 50 μ g ml⁻¹ DiL-LDL or for 15 min with media containing 10 μ g ml⁻¹ anti-TfR and anti-LDLR antibodies.

Sample processing and analysis. *Samples for microscopy.* After the incubation period at 37 °C, cells stimulated as described above were quickly washed once with 37 °C pre-warmed PBS to removed unbound ligands and antibodies and fixed with pre-warmed PFA 3.7% for 20 min at 37 °C. Fixed cells were then washed three washes three times with PBS and one time with PBS supplemented with 50 mM NH₄Cl to quench free PFA. Cells were then permeabilized (0.05% saponin), immunostained and imaged as described below.

Samples to be analysed by plate reader. After the incubation period at 37 °C, cells stimulated as described above were placed on ice to stop membrane traffic, washed with ice-cold PBS to removed unbound antibodies and incubated with

Alexa-488-conjugated secondary antibodies on ice to label non internalized antibodies bound to receptors remaining on the cell surface. Cells were then washed twice with PBS, and fixed on ice with 3.7% PFA for 30 min. Cells were washed twice with PBS and once with 50 mM NH₄Cl in PBS and incubated with DAPI to label their DNA (used to normalized the number of cells in between samples and experiments). Signals from remaining (non-internalized) receptors and DAPI were measured using a FLUOstar Optima (BMG) plate reader.

Samples to be analysed by flow cytometry. After the incubation period at 37 °C, cells stimulated as described above were then placed on ice to arrest membrane traffic, washed with ice-cold PBS to removed unbound ligands, detached by 1 min incubation with 0.25% Trypsin-EDTA at 37 °C, spun, acid-washed (ice-cold stripping buffer (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, glycine) pH 2.5, three washes to remove surface-bound ligands), washed with PBS twice (to restore pH 7.4), fixed (PFA 3.7% for 20 min), washed and re-suspended in PBS and analysed using LSR II flow cytometer (Beckson-Dickinson).

Cell surface labelling. Cell surface staining of HA-GPCR-EGFP and EGFR was performed by incubating cells at 4 °C for 1 h with 10 μ g ml⁻¹ of anti-HA clone 16B12 monoclonal antibody or 10 μ g ml⁻¹ anti-EGFR 13A9 monoclonal antibody respectively, diluted in PBS containing 5% horse serum, followed by a quick wash with cold PBS and fixation (PFA 3.7% for 30 min at 4 °C followed by three washes with PBS and one wash with PBS supplemented with 50 mM NH₄Cl). Cells were then incubated with secondary antibodies diluted in 5% horse serum, and the coverslips were mounted with DABCO anti-fade agent on glass slides and imaged using the laser scanning confocal microscope described below. Signals were imaged by confocal microscopy or surface levels were measured using a FLUOstar Optima (BMG) plate reader.

Immunostaining, laser scanning confocal fluorescent microscopy and analysis. For ligand-induced endophilin-positive assemblies (EPAs), budding cells pre-incubated or not with inhibitors for 5 min were incubated at 37 °C for 4 min with pre-warmed imaging buffer containing the indicated ligands (note that no serum starvation or pre-incubations at 4 °C were performed), quickly rinsed with pre-warmed PBS and fixed (PFA 3.7% for 20 min at 37 °C followed with three washes with PBS and one wash with PBS supplemented with 50 mM NH₄Cl). Cells were then permeabilized (0.05% saponin) and immunostained (primary and secondary antibodies were diluted in 5% horse serum). In some experiments, DRAQ5 (DNA-binding dye, Cell Signaling Technologies 4084), phalloidin-tetramethylrhodamine (Santa Cruz Biotechnology sc-362065) or phalloidin-AlexaFluor 647 (Cell Signaling Technologies 8940) were added with secondary antibodies. The coverslips were mounted with DABCO anti-fade agent on glass slides and imaged using a laser scanning confocal microscope (TCS Sp5 AOBs; Leica) equipped with a 63 $\times$ objective. For Alexa488, the illumination was at 488 nm and emission collected between 498 and 548 nm; for Alexa555 the laser illumination was at 543 nm and emission collected between 555 and 620 nm; for Alexa647 and DRAQ5, the laser illumination was at 633 nm and emission collected between 660 and 746 nm. For each quantification, the number of EPAs within 400 μ m² masks were counted on confocal planes placed at the middle of three representative cells (from independent experiments). The percentages of co-localization of markers on EPAs or endophilin spots located at the leading edge of cells were determined using Volocity 6.0. The levels of endophilin (endogenous and EGFP-tagged constructs) and lamellipodin at the leading edges of cells were measured, for each condition, on masks covering a total at least 100 μ m long (~2 μ m wide) of leading edge of three cells from independent experiments using Volocity 6.0.

Immunostaining and plate reader measurements. Resting or stimulated cells grown on glass bottom 96-well plates were placed on ice to stop membrane traffic, washed with PBS to removed unbound ligands and fixed with 3.7% PFA for 30 min. Cells were washed twice with PBS and once with 50 mM NH₄Cl in PBS and permeabilized and immunostained with primary and secondary antibodies together with DAPI to label DNA (used to normalize the number of cells in between samples and experiments). Signals were measured using a FLUOstar Optima (BMG) plate reader.

Phosphoinositides staining and measurements. Cells grown in glass-bottom 96-well plates were fixed for 1 h at 37 °C with 3.7% (w/v) PFA, 0.1% glutaraldehyde and 0.15 mg ml⁻¹ saponin in 5 mM KCl, 137 mM NaCl, 4 mM NaHCO₃, 0.4 mM KH₂PO₄, 1.1 mM Na₂HPO₄, 2 mM MgCl₂, 5 mM PIPES, pH 7.2, 2 mM EGTA and 5.5 mM glucose, as in ref. 62. Samples were then incubated for 90 min with primary antibodies diluted in 1% BSA, washed, stained with secondary antibodies together with DAPI to label DNA (used to normalize the number of cells in between samples and experiments). Signals were measured using a FLUOstar Optima (BMG) plate reader. The specificity of the antibodies was verified on cells overexpressing the PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4)P₂ and PtdIns(3,4,5)P₃-specific PH domains of PLC γ , TAPP1 and BTK, respectively.

Super-resolution microscopy. Cells were grown on 13 mm #1.5 Hecht Assistant coverslips and processed for immunofluorescence as described above with a few

modifications: for structured illumination microscopy (SIM) we used twice the amount of primary antibodies while for stimulated emission depletion microscopy (STED) both primary and secondary antibodies were used at five times its recommended concentration. Samples were mounted using ProLong gold (Life Technologies). SIM images were acquired in Zeiss Elyra S.1 and processed using the Zeiss acquisition software ZEN. STED images were acquired in a Leica TCS SP8 X gated STED microscope equipped with a 592 depletion laser.

Immuno-electron microscopy. Control and stimulated (10 μ M denopamine, 4 min at 37 °C) BSC1 cells grown on MatTek glass-bottomed Petri dishes were fixed in either 4% paraformaldehyde alone or with the addition of 0.05% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 overnight at 4 °C. After several buffer washes reactive aldehyde groups were inactivated using 0.1% sodium borohydride in phosphate buffer for 30 min, followed by permeabilization with 0.03% saponin in 20 mM phosphate buffer, 150 mM sodium chloride. Cells were then incubated in normal goat serum (Aurion) for 40 min before incubation with 0.5 μ g ml⁻¹ antibody against endophilin for 4.5 h at room temperature. After thorough washing, cells were incubated in a 1:200 dilution of goat anti rabbit ultrasmall gold (Aurion) overnight at 4 °C. Cells were then fixed in 2% glutaraldehyde in phosphate buffer, washed with distilled water followed by silver enhancement of gold using R-Gent SE-EM (Aurion) reagents and post fixed with 0.5% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer on ice for 15 min. Cells were dehydrated in an ascending ethanol series and embedded in CY212 resin. Ultrathin sections were stained with saturated aqueous Uranyl Acetate and Reynolds Lead Citrate and examined using an FEI Technai Spirit EM operated at 80 kV.

Live-cell confocal fluorescent microscopy and analysis. Just before live-cell imaging, the medium of cells grown on MatTek dishes was changed to α -MEM without phenol red, supplemented with 20 mM HEPES, pH 7.4 and 5% FBS and placed into a temperature controlled chamber on the microscope stage with 95% air: 5% CO₂ and 100% humidity. Live-cell imaging data were acquired using a fully motorized inverted microscope (Eclipse TE-2000, Nikon) equipped with a CSU-X1 spinning disk confocal head (UltraVIEW VoX, Perkin-Elmer, England) using a 60 $\times$ lens (Plan Apochromat VC, 1.4 NA, Nikon) under control of Velocity 6.0 (Improvision, England). 14-bit digital images were obtained with a cooled EMCCD camera (9100-02, Hamamatsu, Japan). Four 50 mW solid-state lasers (405, 488, 561 and 647 nm; Crystal Laser and Melles Griots) coupled to individual acoustic-optical tunable filter (AOTF) were used as light source to excite EGFP, Alexa488, TagRFP-T, Alexa555 and 647, as appropriate. Rapid two-colour time-lapses were acquired at 500 ms to 2 s intervals, using a dual (525/50; 640/120, Chroma) emission filter respectively. The power of the lasers supported excitation times of 50 ms in each wavelength and the AOTFs allowed minimum delay ($\sim$ 1 ms) between two colours (for example, delay between green-red for each time point), which was an important factor to assess the co-localization between markers.

Automated unbiased identification of all AP2 fluorescent spots and quantitative tracking of their dynamics as a function of time were performed as in ref. 49. Endophilin-positive assembly (EPA) budding rates represent the number of new EPAs per $5 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ per second, normalized to the average of the control captures. Co-localization scorings were performed on at least 100 EPAs at the plasma membrane, from three cells imaged during independent experiments.

Signal transduction and immunoblotting. Cells grown on 6-well plates were transfected with siRNAs and transferred to 24-well plates on the following day. Three days after transfection cells were serum starved for 4 h and stimulated at 37 °C with 5 or 100 ng ml⁻¹ EGF diluted in serum-free α -MEM (Life Technologies) for the indicated times. After each time points, cells were quickly collected in Laemmli sample buffer, sonicated and boiled. Samples were run on NuPage 4–12% Bis-Tris gel (Life Technologies), transferred to nitrocellulose membranes, blocked in 5% skimmed milk and incubated successively with primary and secondary-HRP coupled antibodies and finally visualized with ECL Plus, Pico or Femto (Thermo) reagents depending on the strength of the signals. Signals were captured on a BioRad Geldoc XR+ system and analysed using the ImageLab software (BioRad). Signals used for quantifications were captured at a pre-saturation intensity. Signals were normalized to the time point zero or 30 of the control sample for the 5 ng ml⁻¹ and 100 ng ml⁻¹ experiments, respectively.

cAMP was measured using the Cyclic AMP XP chemiluminescent assay kit (Cell Signaling Technologies, 8019) following the manufacturer's instructions. Signals were measured on a FLUOstar Optima plate reader (BMG).

PathScan Intracellular Signalling and EGFR Signalling Antibody Arrays (Cell Signaling Technology 7744 and 12785, respectively) were used according to the manufacturer and fluorescent signals were measured using an Odyssey (LI-COR) reader.

Plasma membrane isolation. Cell surface protein isolation, excluding intracellular proteins, was performed by selective biotinylation using a cell-impermeable, cleavable biotinylation reagent (Sulfo-NHS-SS-Biotin) followed by purification of

surface proteins by affinity-purified NeutrAvidin Agarose Resin (Thermo Scientific 89881).

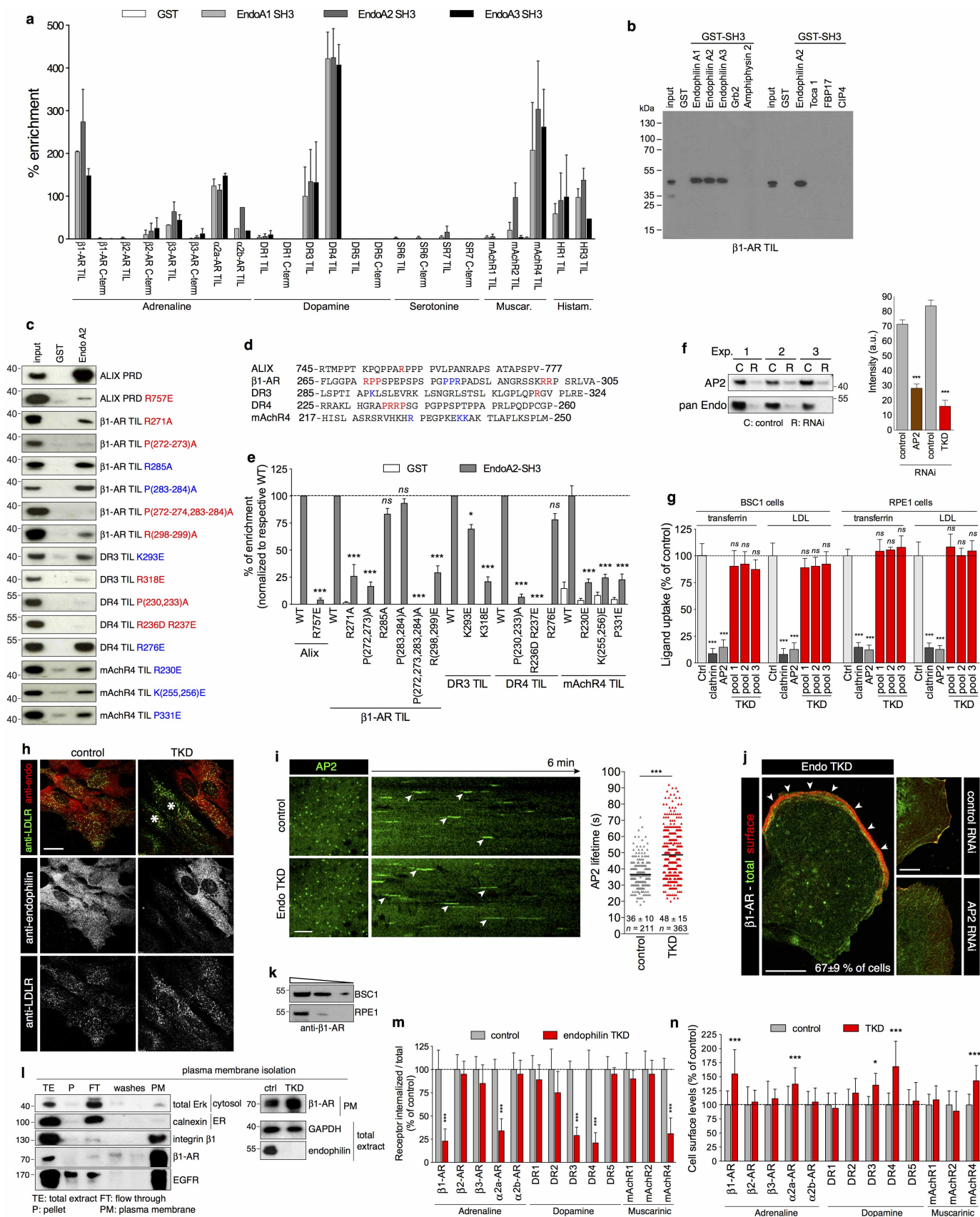
Wound-healing cell migration assay. BSC1 and RPE1 cells were grown in 6-well plates in their respective media for 24 h. A mechanical wound was introduced in the middle of the confluent layers of cells and the cells were allowed to grow in fresh media supplemented or not with the indicated inhibitors at 37 °C. Images were taken immediately after the wound and regularly until the end of the assay (16 h). Cell migration was measured by the reduction of free space between the two pictures and normalized to the mean of control cells.

PC12 neurite outgrowth assay. PC12 cells were grown in in RPMI 1640 containing 7.5% heat-inactivated horse serum, 7.5% FBS and subcultured using trypsin in type IV collagen coated flasks (BD Biocoat, Cat No 354523). Cells were detached, re-suspended in PBS, counted and electroporated with 20 pmol siRNA in 10 μ l tips using a Neon electroporation system (Life Technologies) set to a single pulse of 1,410 V for 30 ms. Cells were immediately transferred to warmed medium containing or not NGF (2.5S subunit, 100 ng ml⁻¹) and plated onto dishes coated with poly-L-lysine/type I collagen 25:1 at a density of 1×10^4 cells cm⁻². After 2 days, cells were re-transfected with silencing RNAs using Lipofectamine RNAi MAX according to manufacturer's instructions. Cells were re-fed with or without NGF every 48 h.

Statistical analysis. Results shown are mean $\pm$ standard error of the mean (s.e.m.). Statistical testing was performed using Prism 6 (GraphPad Software). Data were tested for Gaussian distribution with Kolmogorov–Smirnov test with the Dallal–Wilkinson–Lillie for corrected *P* value. In case of Gaussian distribution, the following parametric tests were used: Student's *t*-test (2 groups) or one-way ANOVA and Dunnett's test (2+ groups), as appropriated. In case of non-Gaussian distribution, the following non-parametric tests were used: two-tailed Mann–Whitney *U*-test (2 groups) or Kruskal–Wallis one-way ANOVA and Dunnett's test (2+ groups), as appropriated.

Significance of mean comparison is annotated as follow: NS, not significant; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. No statistical methods were used to pre-determine sample size.

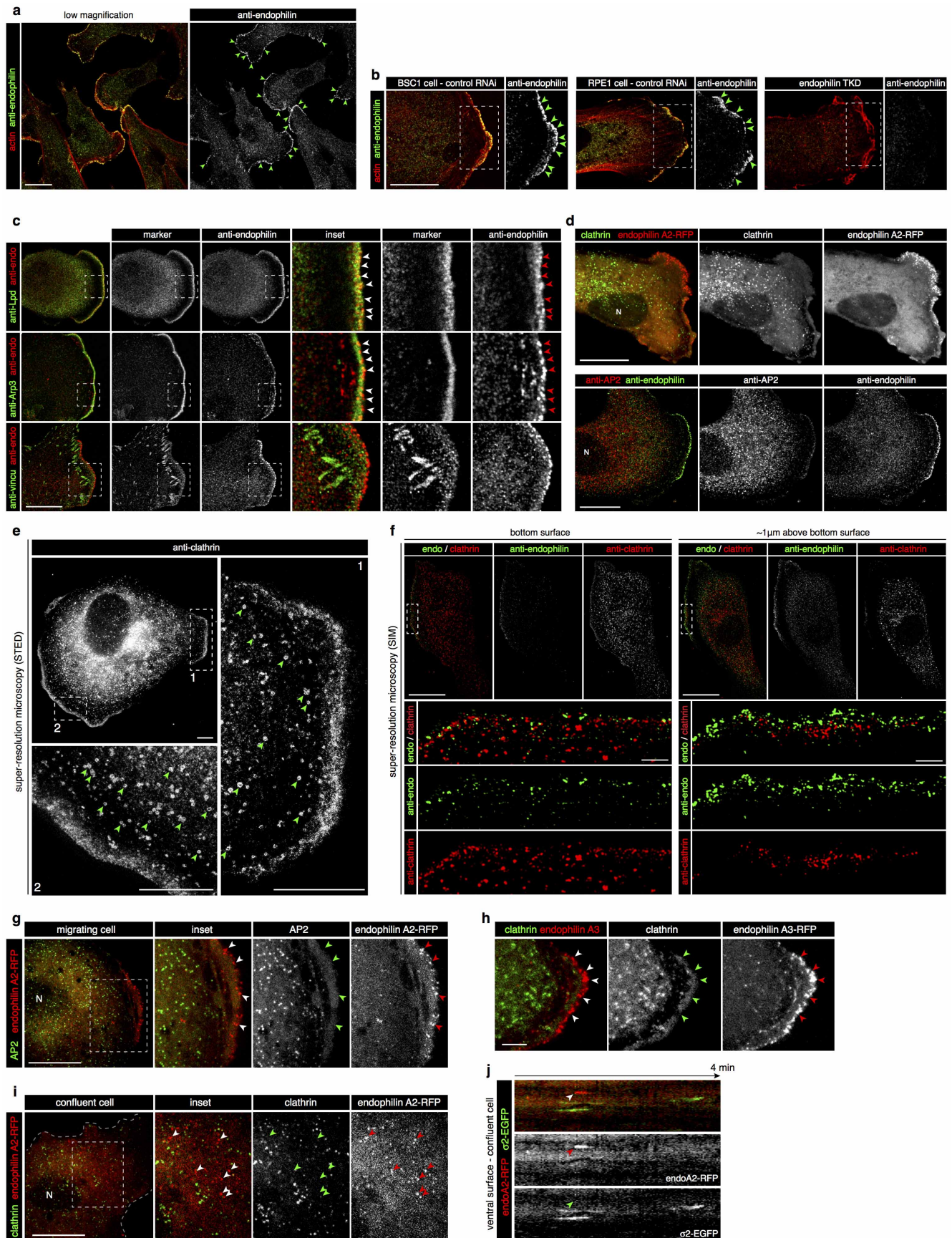
45. Shaner, N. C. *et al.* Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods* **5**, 545–551 (2008).
46. Usami, Y., Popov, S. & Gottlinger, H. G. Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site. *J. Virol.* **81**, 6614–6622 (2007).
47. Ford, M. G. *et al.* Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* **291**, 1051–1055 (2001).
48. Marks, B. *et al.* GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* **410**, 231–235 (2001).
49. Henne, W. M. *et al.* FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science* **328**, 1281–1284 (2010).
50. Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. & Robinson, M. S. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* **162**, 909–918 (2003).
51. Subtil, A., Hemar, A. & Dautry-Varsat, A. Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *J. Cell Sci.* **107**, 3461–3468 (1994).
52. Pelish, H. E. *et al.* Secramine inhibits Cdc42-dependent functions in cells and Cdc42 activation in vitro. *Nature Chem. Biol.* **2**, 39–46 (2006).
53. Macia, E. *et al.* Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* **10**, 839–850 (2006).
54. Howes, M. T. *et al.* Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Biol.* **190**, 675–691 (2010).
55. Hill, T. A. *et al.* Inhibition of dynamin mediated endocytosis by the dynoles–synthesis and functional activity of a family of indoles. *J. Med. Chem.* **52**, 3762–3773 (2009).
56. Joshi, S. *et al.* The dynamin inhibitors MiTMAB and OcTMAB induce cytokinesis failure and inhibit cell proliferation in human cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **9**, 1995–2006 (2010).
57. Schlegel, R., Dickson, R. B., Willingham, M. C. & Pastan, I. H. Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of alpha 2-macroglobulin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 2291–2295 (1982).
58. Wang, L. H., Rothberg, K. G. & Anderson, R. G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J. Cell Biol.* **123**, 1107–1117 (1993).
59. Gibson, A. E., Noel, R. J., Herlihy, J. T. & Ward, W. F. Phenylarsine oxide inhibition of endocytosis: effects on asialofetuin internalization. *Am. J. Physiol.* **257**, C182–C184 (1989).
60. Heuser, J. E. & Anderson, R. G. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* **108**, 389–400 (1989).
61. Larkin, J. M., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Anderson, R. G. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* **33**, 273–285 (1983).
62. Yip, S. C. *et al.* Quantification of PtdIns(3,4,5)P₃ dynamics in EGF-stimulated carcinoma cells: a comparison of PH-domain-mediated methods with immunological methods. *Biochem. J.* **411**, 441–448 (2008).



Extended Data Figure 1 | Endophilin binds to some GPCRs and is dispensable for clathrin-mediated endocytosis. Related to Fig. 1.

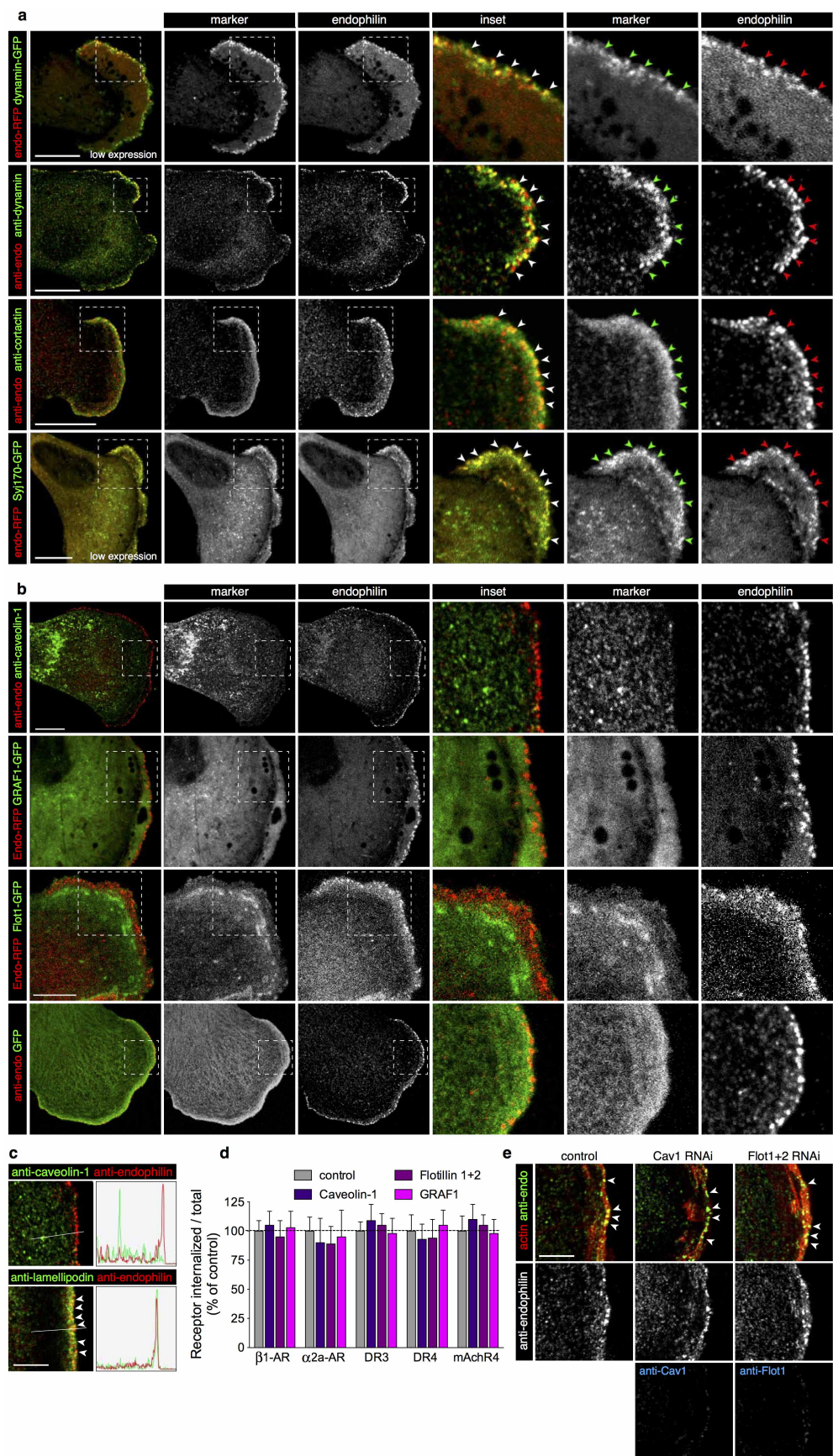
a, Quantification of the binding of indicated cytosolic fragments of adrenergic, dopaminergic, serotonergic, muscarinic (Muscar.) and histaminergic (Histam.) receptors (see Fig. 1a for an example of one set of immunoblots) to the indicated GST-SH3 domains (or GST as control). The percentage enrichment of receptor tails in pulled-down fractions with respect to their respective levels in the original cell extracts (input) is shown (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **b**, Binding of GST-SH3 domains from BAR and F-BAR containing proteins to β_1 -AR third intracellular loop (TIL), showing specificity for endophilin-A SH3 domains. **c**, Pull-down experiments using GST-SH3 domains of endophilin-A2 (or GST as a control) with EGFP-tagged fragments coding for the TILs of the indicated receptors bearing the depicted mutations. Mutations decreasing binding are shown in red; the ones without significant effects are in blue. ALIX PRD domain and its R757E mutant⁵⁸ were used as positive and negative controls. **d**, Amino acid sequence around point mutations tested showing potential endophilin-binding motifs. **e**, Quantification of the binding of indicated mutated cytosolic fragments (see **c** for an example of one set of immunoblots) to the indicated GST-SH3 domains (or GST as control). The percentage enrichment of receptors tails in pulled-down fractions with respect to their respective levels in the original cell extracts (input) is shown (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments; NS, non-significant, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, one-way ANOVA and Dunnett's test versus respective wild-type). **f**, Verification of AP2 and Endo1+2+3 depletion by RNAi from three independent control ('C') and RNAi ('R') experiments. Immunoblot (left) and bar graph (right) representations of the data are shown (means $\pm$ s.e.m. from three independent experiments; $***P < 0.001$, Student's *t*-test versus respective control). **g**, Transferrin and LDL uptake was inhibited by clathrin and AP2 RNAi but not by control (Ctrl) or endophilin-A triple RNAi (TKD, three different pools). Ligand uptake was measured by flow cytometry (mean $\pm$ s.e.m., 10,000 cells per experiment, $n = 3$ independent experiments; NS, non-significant, $***P < 0.001$, one-way ANOVA and Dunnett's test versus respective control). **h**, Anti-LDLR antibody uptake assay in control or TKD RPE1 cells. Cells were immunostained for anti-LDLR (post feeding) and endophilin (red). Cells strongly depleted for endophilin (*) showed similar LDLR endocytosis to control cells, showing that LDLR endocytosis is not dependent on endophilin-A proteins (images representative of ten captures). **i**, Dynamics of clathrin-coated pits in BSC1 cells marked by σ 2-EGFP (AP2) and acquired by live-cell

spinning-disk confocal microscopy imaging. Left pictures show representative images from the bottom surface of cells; right pictures are kymographs (time projections) representative of five captures from control and Endo1+2+3 RNAi cells. Right: plot of individual lifetimes of clathrin/AP2 pits calculated from live imaging of 4 cells for each condition. Those had significant longer lifetimes in TKD cells, perhaps related to a reduced synaptojanin recruitment to membranes and thus an increase in PtdIns(4,5)P₂ levels^{5,20} (bars, means; $n = 211$ and 363 from 3 independent experiments, mean $\pm$ s.e.m. is written at the bottom, $***P < 0.001$, Mann-Whitney *U*-test). **j**, Surface staining of β_1 -AR using the HA- β_1 -AR-EGFP construct. Control, AP2 RNAi and endophilin TKD cells were directly stained for steady-state accumulation of β_1 -AR at their cell surface and imaged using a confocal microscope (images are representative of five captures). In endophilin TKD cells β_1 -AR accumulated in a limited area of the plasma membrane, similar to the area stained with lamellipodin in Extended Data Fig. 2c. This panel complements that in Fig. 1b showing a lack of internalization of β_1 -AR in TKD cells. **k**, Immunoblots showing the expression of β_1 adrenergic receptor (β_1 -AR) in BSC1 and RPE1 cells. Decreasing amount of cell extracts were loaded from left to right. **l**, Left: isolation of a plasma membrane fraction (see Methods) showed accumulation of β_1 -adrenergic receptors after endophilin RNAi. Erk was used to monitor cytosolic proteins, calnexin endoplasmic reticulum proteins and integrin β_1 , β_1 -adrenergic receptor (β_1 -AR) and EGFR to monitor plasma membrane proteins. Note that the plasma membrane fraction (PM) was enriched in plasma membrane proteins and did not contain cytosolic ERK or ER-localized calnexin. Right: levels of β_1 -AR were enriched in the plasma membrane fraction from TKD cells versus control cells. **m**, Bar graph shows the amounts of internalized/total depicted HA-receptor-EGFP in control (grey) or endophilin TKD (red) samples (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; $***P < 0.001$, Student's *t*-test versus respective control). **n**, Surface staining of HA-receptor-EGFP constructs (see Fig. 1b, c). Cells were directly stained with anti-HA antibody at 4 °C and measured using a plate reader to assay the steady-state accumulation of receptors at the cell surface. The cell surface signals (HA) were corrected for expression levels (EGFP) and the values were normalized to the mean of the control cells (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; $***P < 0.001$, Student's *t*-test versus respective control). The same receptors that showed a decreased endocytosis (**m**) show an increased surface accumulation here, an effect that is dependent on ligand activation. Scale bars: 20 μ m (**h**), 10 μ m (**j**) and 5 μ m (**i**).



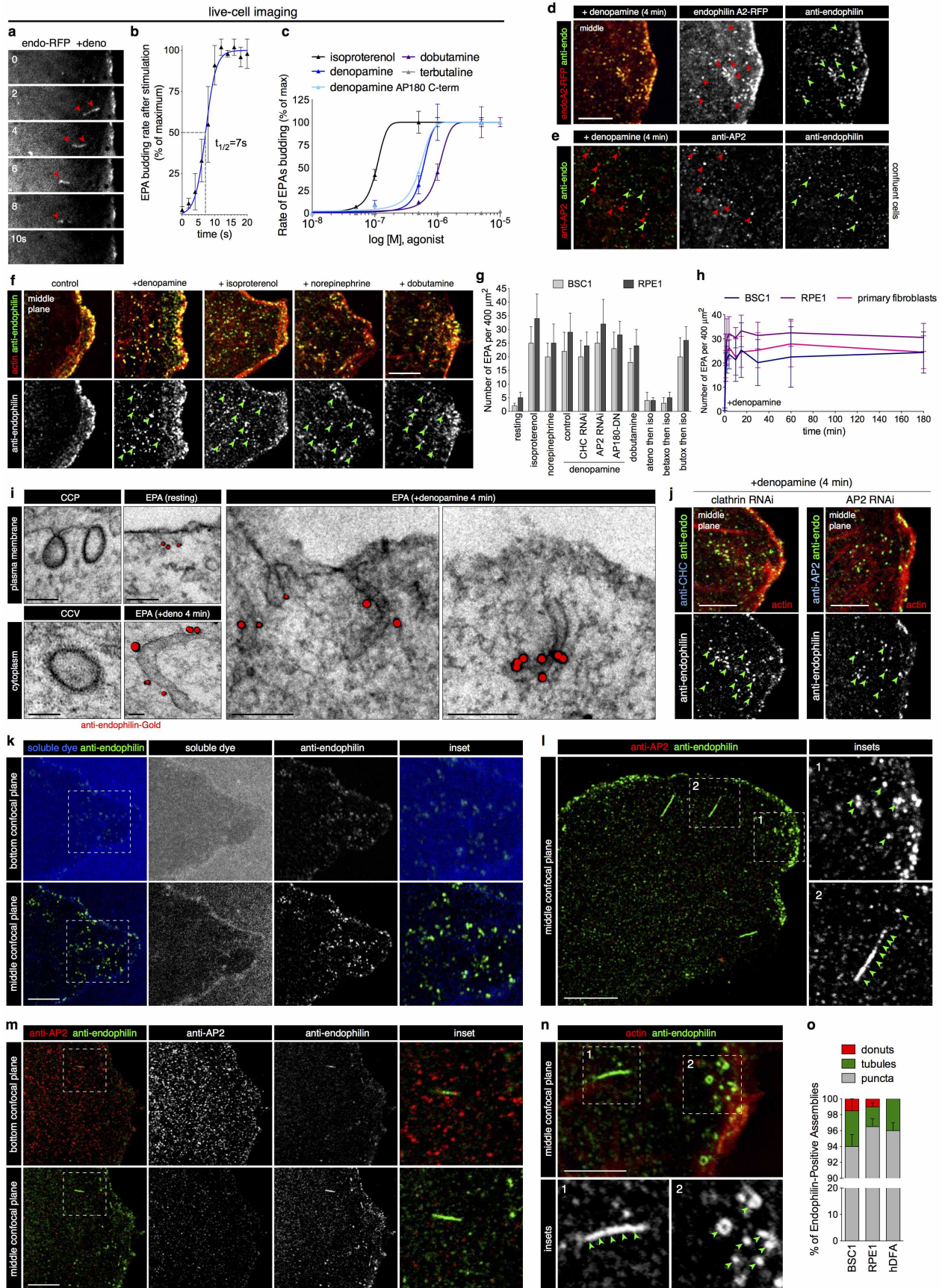
Extended Data Figure 2 | Endophilin and clathrin did not co-localize at the leading edge of cells by standard and super-resolution microscopy. Related to Fig. 1. **a, b**, Confocal microscopy images (optical planes from the middle of cells) showing endogenous staining of endophilin (green) in BSC1 cells (low magnification in **a** and higher magnification in **b**, left panel) and in a normal diploid RPE1 cell (middle). Images in **b** were oriented with leading edges (identified by phalloidin staining (actin, red)) pointing to the right. Arrowheads point to endophilin puncta on the leading edge of these cells. Right: there was no anti-endophilin staining in endophilin-A TKD cells, validating the specificity of the antibody. Insets are zooms of the boxed areas. **c**, Confocal microscopy images showing endogenous staining of lamellipodin, Arp3 or vinculin (all green) and endophilin (red) in BSC1 cells. Insets are zooms of the boxed areas. Endophilin co-localized with lamellipodin and Arp3 at the leading edge but not with vinculin (a marker of focal adhesions). **d**, Top: same data as in Fig. 1c but showing the individual channels. Confocal microscopy images showing clathrin (EGFP-LCa, green) and endophilin (endophilin A2-RFP, red) in a live BSC1 cell. 'N' denotes the nucleus. Bottom: confocal microscopy images showing endogenous staining of α -adaptin (AP2), and endophilin (red) in BSC1. Endogenous staining also shows an enrichment of endophilin at the leading edge. **e**, Super-resolution stimulated emission depletion (STED) microscopy images of a BSC1 cell immunostained for clathrin and showing coated pits and vesicles labelled at the ventral surface of the cell but not at the leading edges where the staining was diffused.

f, Super-resolution structured illumination microscopy (SIM) images of a BSC1 cell immunostained for clathrin (red) and endophilin (green). Note the absence of co-localization between the two markers. **g**, Confocal microscopy images (bottom surface optical section) showing the localization of AP2 (σ 2-EGFP, green) and endophilin (EndoA2-RFP, red) in a live migrating cell. Arrowheads point to endophilin A2 puncta at the leading edge of the cell; these are negative for AP2. Inset is a zoom of the boxed area. **h**, Confocal microscopy images showing a lack of co-localization of clathrin (EGFP-LCa, green) and the other endophilin-A expressed in BSC1 cells: endophilin A3 (endophilin A3-RFP, red). Arrowheads point to endophilin A3 puncta at the leading edge of live BSC1 cells; these are negative for clathrin puncta. **i**, Confocal microscopy images (optical section of bottom surface) showing clathrin (EGFP-LCa, green) and endophilin (EndoA2-RFP, red) localization in a live confluent BSC1 cell (thus no leading edge). Neighbouring cells were not transfected. Arrowheads point to endophilin A2 puncta at the bottom surface of the cell; most of these are negative for AP2. Inset is a zoom of the boxed area. **j**, Representative kymographs of AP2 (σ 2-EGFP) and endophilin (EndoA2-RFP) from live-cell imaging acquired at the ventral surface of a confluent cell. The arrowhead points to an endophilin-positive track devoid of AP2. Images and kymographs are representative of at least ten captures, from three independent experiments. Scale bars: 20 μ m (**a, d**), 10 μ m (**b, c, f, e**), 5 μ m (**e, h**) and 1 μ m (**f** insets).



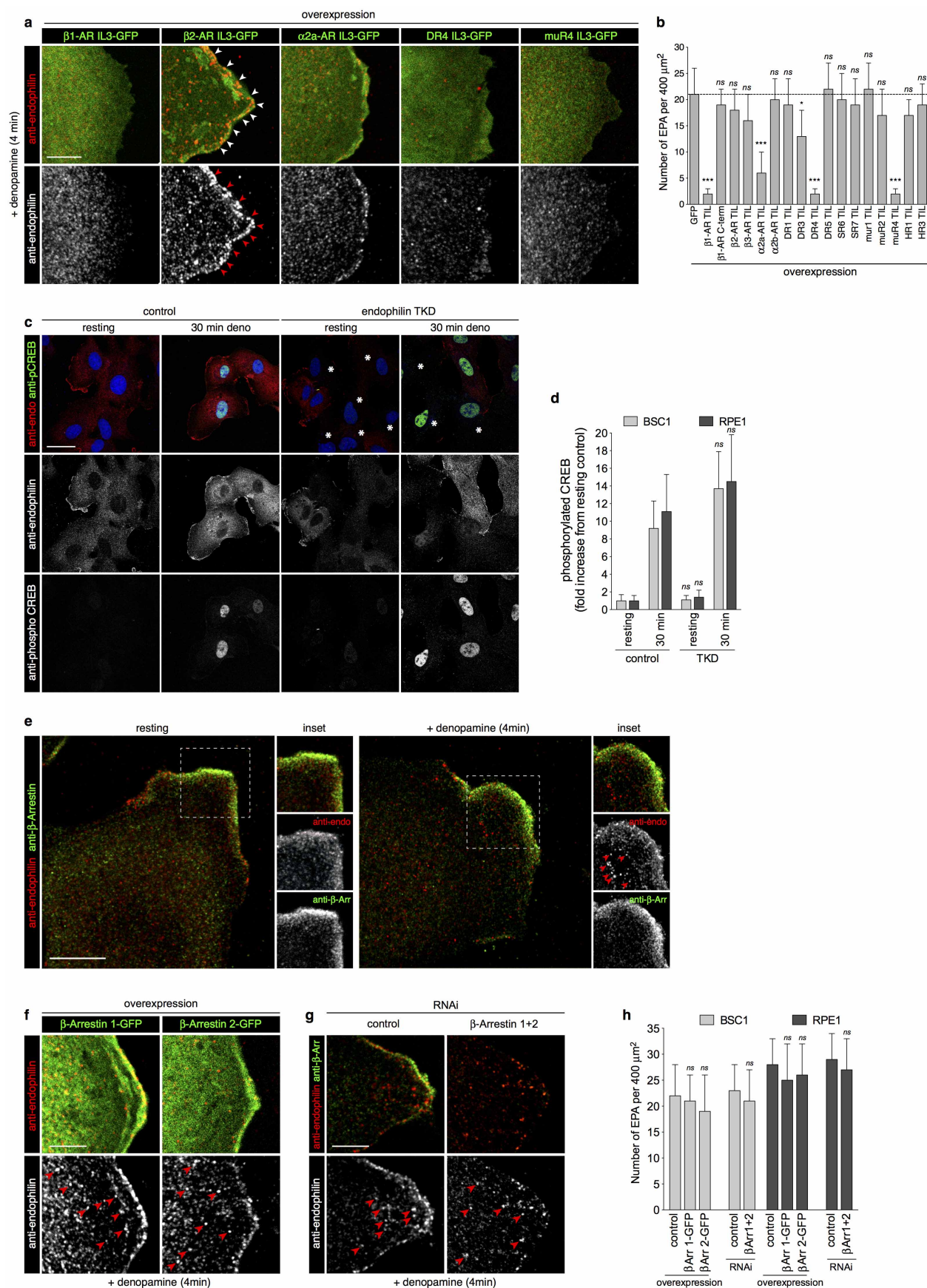
Extended Data Figure 3 | Endophilin co-localized with dynamin, cortactin and synaptojanin but not with known clathrin-independent endocytosis markers. Related to Fig. 1. **a**, Representative confocal images showing the co-localization of endophilin (endoA2-RFP or anti-endophilin, red) with dynamin (dynamin2-EGFP expressed at low levels, or anti-dynamin for endogenous protein (green)), cortactin (anti-cortactin for endogenous protein) or synaptojanin (synaptojanin 1-170-EGFP expressed at low levels). Insets are zooms of the boxed areas. **b**, Representative confocal images showing the absence of co-localization between endophilin (anti-endophilin, or endoA2-RFP, red) and caveolin 1 (endogenous), GRAF1-EGFP and flotillin 1-EGFP. The bottom row shows the background co-localization of endophilin with a soluble protein (EGFP). Arrowheads point to endophilin puncta at the leading edge of cells; these were negative for the markers tested. Insets are

magnifications of the boxed areas. **c**, Co-localization of endogenous endophilin (red) with lamellipodin, but not caveolin-1 (green). Images were oriented with the leading edges to the right. Arrowheads point to co-localization between markers. Intensity profiles were acquired along the indicated lines. **d**, Receptor uptake assay (HA-receptor-EGFP internalized corrected for their total levels) in cells pre-treated with the indicated RNAi (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **e**, Confocal images of cells treated with caveolin-1 (Cav1) or flotillin 1 and 2 (Flot1+2) or control siRNA and immunostained for endophilin (green) and actin (red). Cells were counter-stained (blue) for caveolin 1 (Cav1) or flotillin-1 (Flot1) to ascertain for the depletion of the targeted proteins in the cells imaged. Images are representative of at least ten captures, from three independent experiments. Scale bars: 10 μ m (**a**) and 5 μ m (**b**, **c** and **e**).



Extended Data Figure 4 | Formation of endophilin-positive tubules and vesicles upon β_1 -adrenergic receptor activation. Related to Fig. 1. **a**, Images from a time-lapse acquired by spinning-disk confocal microscopy of a BSC1 cell expressing low levels of endophilin-A2-RFP, after addition of 10 μ M of denopamine ($t = 0$). Arrowheads point to a tubulo-vesicular carrier formed upon stimulation and moving from the cell edge (right) to the cell centre (left). See also Supplementary Video 3. **b**, The budding rate of endophilin-positive assemblies (EPAs), measured as number of EPAs $\mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, after stimulation with denopamine (added at $t = 0$). Data were acquired from data sets similar to Supplementary Video 3 and normalized to the maximum budding rate (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **c**, Budding of endophilin-mRFP-positive structures determined by live-cell imaging after addition of various β_1 -AR (isoproterenol, dobutamine and denopamine) or β_2 -AR (isoproterenol, terbutaline) agonists concentrations. Data are expressed as the percentage of maximum budding. See also Supplementary Video 3. Terbutaline, the specific β_2 -AR agonist, does not stimulate EPA production. Inhibition of clathrin-mediated endocytosis by AP180 C terminus expression does not affect EPA formation stimulated by the β_1 -AR agonist denopamine (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **d**, Representative confocal images (optical planes located at the middle of cells) showing the co-localization of endophilin A2-RFP (red) with endogenous endophilin (green) in a BSC1 cell stimulated with denopamine (10 μ M for 4 min), validating the targeting of exogenously expressed endophilin in our experiments. **e**, Representative confocal images (optical section located at the middle of cells) of confluent cells stimulated for 4 min with 10 μ M denopamine and stained for endogenous endophilin (green) and α -adaptin (AP2, red). **f**, Representative confocal images (optical section located at the middle of cells) of sparse (**f**) or confluent (**e**) cells stimulated for 4 min with the indicated adrenergic agonists and stained for endogenous endophilin (green) and actin (phalloidin, red). **g**, Quantification of EPAs in BSC1 and RPE1 cells upon stimulation with adrenergic receptor agonists in control, AP2 RNAi or AP180 dominant-negative-expressing cells or in cells pre-treated (5 min) with beta-blockers before stimulation (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **h**, Quantification of the number of endogenous EPAs per 400 μm^2 in BSC1, RPE1 cells and in primary fibroblasts upon stimulation with 10 μ M

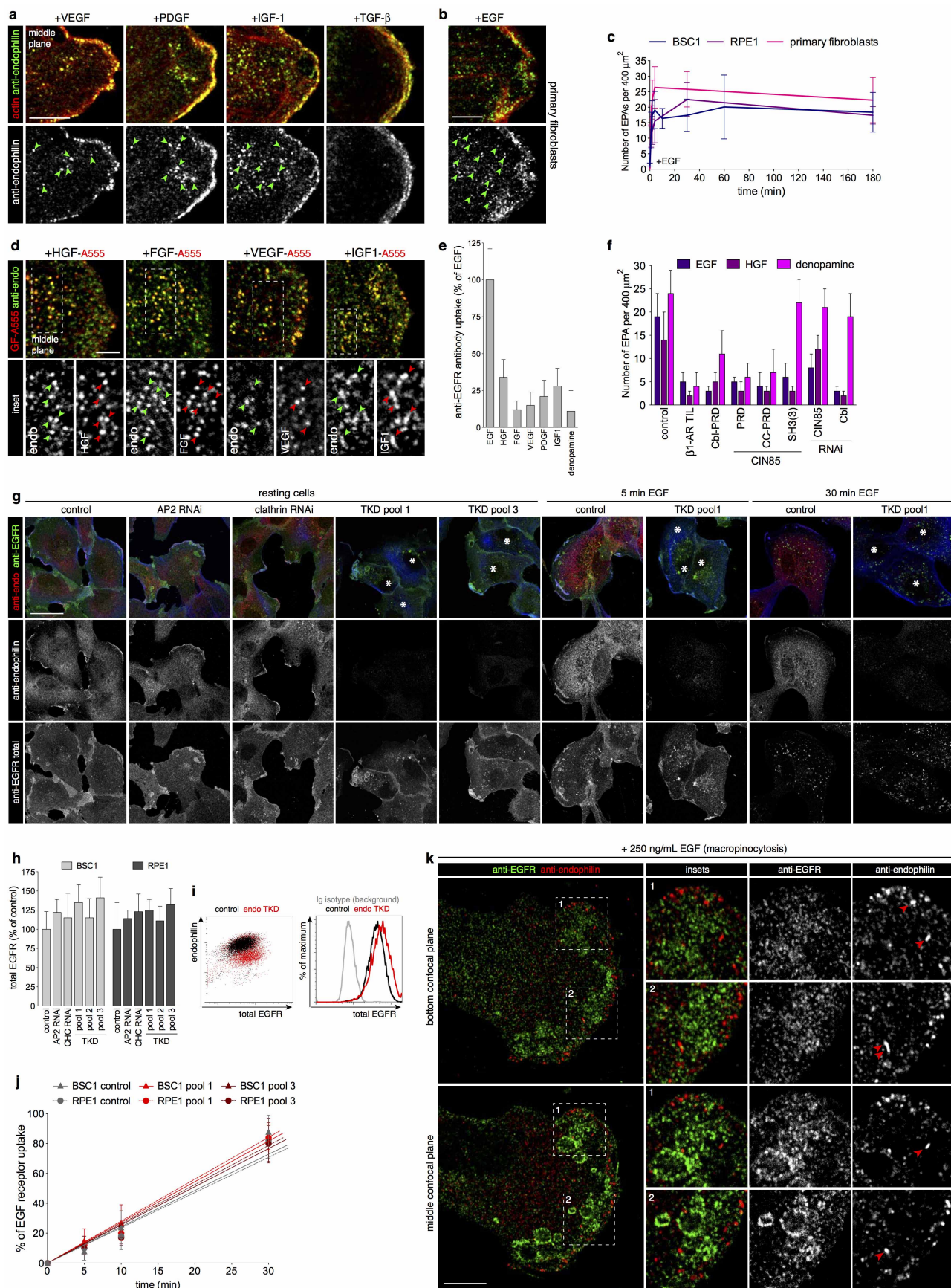
denopamine for the indicated amounts of time (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **i**, Immuno-electron microscopy of BSC1 cells fixed 4 min after addition of 10 μ M denopamine (deno) to the medium or in absence of stimulation (control). Anti-endophilin antibodies were detected with a gold-conjugated secondary antibody (red balls). The two pictures on the left show clathrin-coated pits (top) and a potential vesicle (bottom). The other images are membrane structures at the plasma membrane and in the cytoplasm positive for the anti-endophilin antibody (endogenous endophilin). **j**, Representative confocal images (optical section located at the middle of cells) of cells depleted for clathrin (left, same image as in Fig. 1e) or AP2 and stimulated with denopamine (10 μ M) for 4 min before fixation. Endogenous endophilin (green) clathrin or AP2 (blue) and actin (phalloidin, red) were immunostained. **k**, Confocal microscopy images of a stimulated (10 μ M denopamine for 4 min) RPE1 cell grown on a poly-lysine-coated coverslip, incubated in soluble lysine-fixable Alexa647 dye, fixed and immunostained for endophilin (green). On the confocal plane taken at the bottom of the cell (dye in focus), no endophilin spots can be seen (out of focus). On a confocal plane at the middle of the cell (dye outlines the cell cross-section) EPAs are in focus, indicating that they are in the cytoplasm and not at the cell surface. **l**, Example of a BSC1 cell treated and immunostained as in **m** and imaged at the middle of the cell and showing several endophilin-positive tubules and diffraction-limited puncta. **m**, Confocal microscopy images of a stimulated (10 μ M denopamine for 4 min) BSC1 cell fixed and immunostained for α -adaptin (AP2, red) and endophilin (green). On the confocal plane taken at the bottom of the cell AP2 spots (known to be located at the plasma membrane) are in focus but EPAs are out of focus. On a confocal plane at the middle of the cell AP2 spots are out of focus but EPAs are in focus, indicating that they are inside the cytoplasm and not at the plasma membrane. **n**, Confocal microscopy images of EPAs labelled by endophilin. Arrowheads show diffraction-limited punctates, tubules and 'doughnut-like' vesicles structures. **o**, Quantification of the occurrence in stimulated BSC1, RPE1 and human primary dermal fibroblasts of the three different endophilin-positive structures: diffraction-limited punctates (grey), tubules (green) and 'doughnut-like' vesicles (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). Images are representative of at least ten captures, from three independent experiments. Scale bars: 5 μ m apart from **i**, which is 250 nm.



Extended Data Figure 5 | $\beta 1$ and $\beta 2$ arrestins were not essential in $\beta 1$ -adrenergic receptor agonist stimulation of endophilin vesicle formation.

Related to Fig. 1. **a**, Representative confocal images (optical planes located at the middle of cells) of cells overexpressing the indicated EGFP-tagged receptors TIL (green), stimulated with 10 μ M denopamine for 4 min and immunostained for endophilin (red) (images are representative of ten captures from three independent experiments). **b**, Quantification of the number of endogenous EPAs in cells overexpressing the indicated EGFP-tagged receptors TIL and stimulated with 10 μ M denopamine for 4 min (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; NS, non-significant, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, one-way ANOVA and Dunnett's test versus GFP). **c**, Confocal microscopy images of control and endophilin TKD cells, resting or stimulated (10 μ M denopamine for 4 min) and immunostained for phosphorylated CREB (pCREB, green), endophilin (red) and DNA (DRAQ5, blue) (images are representative of ten captures from three independent experiments). Asterisks

denote cells with strongly reduced endophilin levels. **d**, Plate reader quantification of BSC1 or RPE1 cells treated as in **a** (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; NS, non-significant, Student's *t*-test versus respective control). **e**, Confocal microscopy images of control and stimulated (10 μ M denopamine for 4 min) cells immunostained for β -arrestin (green) and endophilin (red). EPAs (arrowheads) did not contain β -arrestin (images representatives of ten captures from three independent experiments). **f**, **g**, Confocal microscopy images of cells overexpressing β -arrestin-1 or 2-EGFP (**f**, green) or β -arrestin 1 + 2 KD cells (**g**), stimulated with denopamine (10 μ M for 4 min), fixed and immunostained for endophilin (red) and β -arrestin (**g**, green) (images representatives of at least ten captures). **h**, Plate reader quantification of BSC1 or RPE1 cells treated as in **e–g** (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; NS, non-significant, one-way ANOVA and Dunnett's test versus respective controls). Scale bars: 40 μ m (**c**) and 5 μ m (**a**, **e–g**).



Extended Data Figure 6 | Several growth factors stimulated the formation of endophilin-positive assemblies. Related to Fig. 2. **a**, Confocal images

(optical planes from the middle of cells) of BSC1 cells treated for 4 min with the indicated growth factors (all at 10 ng ml^{-1}) and immunostained for endogenous endophilin-A (green). Cells were oriented with their leading edges (identified with phalloidin staining (actin, red)) pointing to the right (images are representative of ten captures from three independent experiments).

Arrowheads show internal vesicles positive for endogenous endophilin in the VEGF, PDGF and IGF-1-treated but not TGF- β -treated cells (see also quantification in Fig. 2c). **b**, EPA production in a primary fibroblast from an adult donor treated for 4 min with 50 ng ml^{-1} EGF and immunostained for endogenous endophilin-A (green). The image is representative of eight captures.

c, Quantification of the number of endogenous EPAs per $400 \mu\text{m}^2$ in BSC1, RPE1 cells or primary fibroblasts upon stimulation with 50 ng ml^{-1} EGF for the indicated amounts of time (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **d**, Confocal section of a BSC1 cell fixed 4 min after addition of 50 ng ml^{-1} Alexa555-labelled EGF, HGF, FGF, VEGF and IGF-1 to the medium. Endogenous endophilin (green) was detected as in **a**. Arrowheads

point to internal vesicles positive for endogenous endophilin and containing internalized growth factors (images are representatives of at least eight captures). **e**, Plate reader quantification of BSC1 cell incubated with a monoclonal antibody anti-EGFR (13A9, green), that does not interfere with EGF binding, and 50 ng ml^{-1} of the indicated ligands. There is no cross-talk between EGFR and activation of other growth factor receptors or activation of

$\beta 1$ adrenergic receptors. Thus, endophilin-positive structures only have EGFR when stimulated by EGF (see Fig. 2d, e), and likewise on $\beta 1$ adrenergic receptor activation there is no EGFR in the endophilin-positive structures.

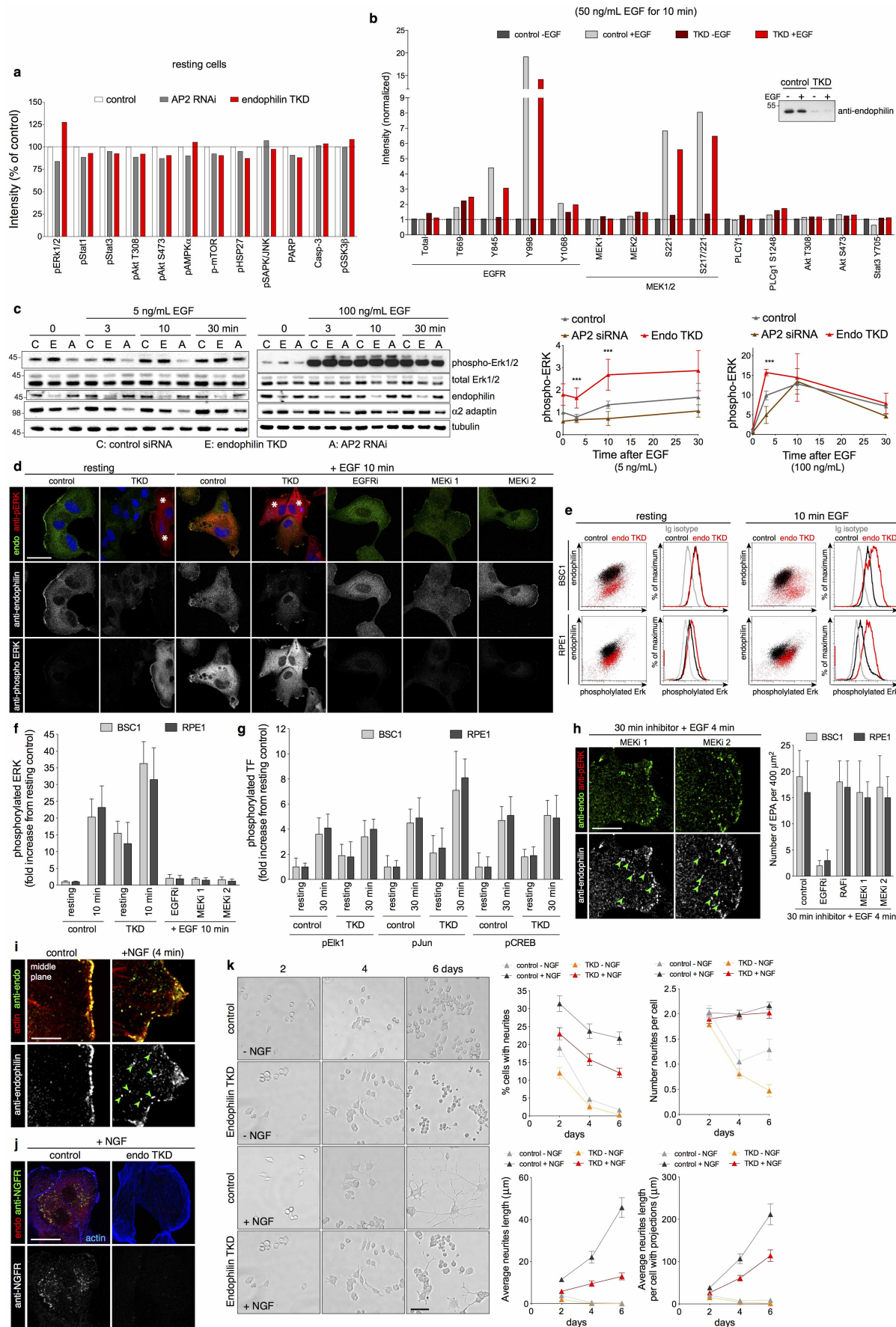
This reinforces the theme that one needs specific receptor activation to transduce a signal across the membrane to activate EPA formation (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **f**, Quantification of the number of EPAs in cells depleted for CIN85 or Cbl or overexpressing $\beta 1$ -AR

TIL, Cbl-PRD or CIN85-PRD, -CC-PRD, SH3(3) and stimulated with EGF (blue), HGF (purple) or denopamine (fuchsia) (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **g**, Confocal images of control, AP2, clathrin or endophilin TKD (pools 1 and 3) treated cells, fixed and immunostained for EGFR (green) and endophilin (red) (images are representative of at least ten captures). Asterisks denote cells with strongly reduced endophilin levels.

h, Plate reader quantification of BSC1 and RPE1 treated as in **g** (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **i**, Flow cytometry profiles of total EGFR levels in control (black) or TKD (red) cells. $n = 50,000$ cells for each conditions.

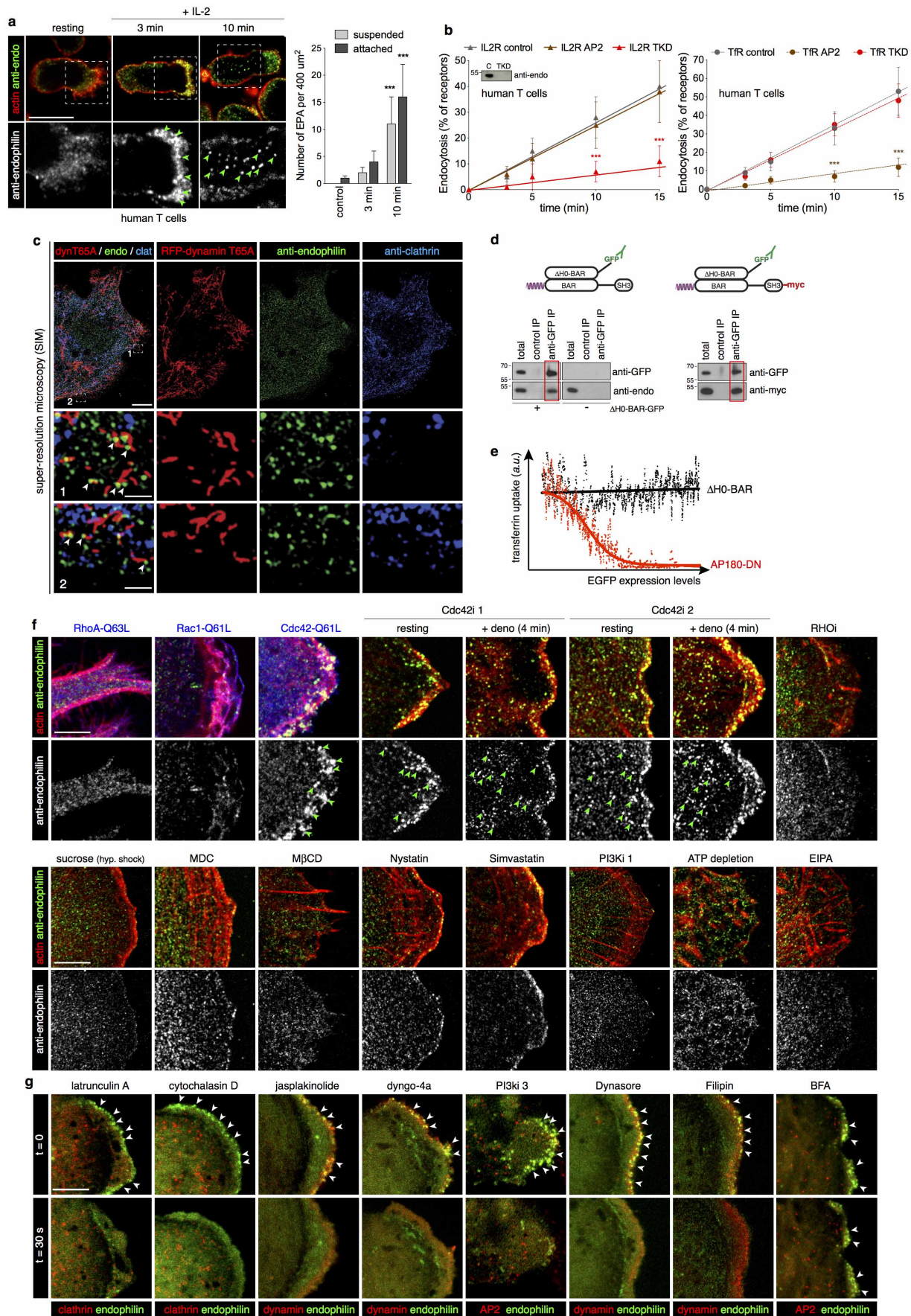
j, Plate reader quantification of control or endophilin TKD BSC1 and RPE1 treated with 50 ng ml^{-1} EGF for the indicated time (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **k**, Confocal images of a BSC1 cell stimulated for 5 min with 250 ng ml^{-1} EGF, fixed and immunostained for EGFR (green) and endophilin (red) (images are representative of eight captures). Note that EPAs (arrowheads) are distinct from the large vacuole-like structures which are called macropinosomes, seen best in the middle confocal plane. Scale bars:

$40 \mu\text{m}$ (**g**), $10 \mu\text{m}$ (**k**) and $5 \mu\text{m}$ (**a-c**).



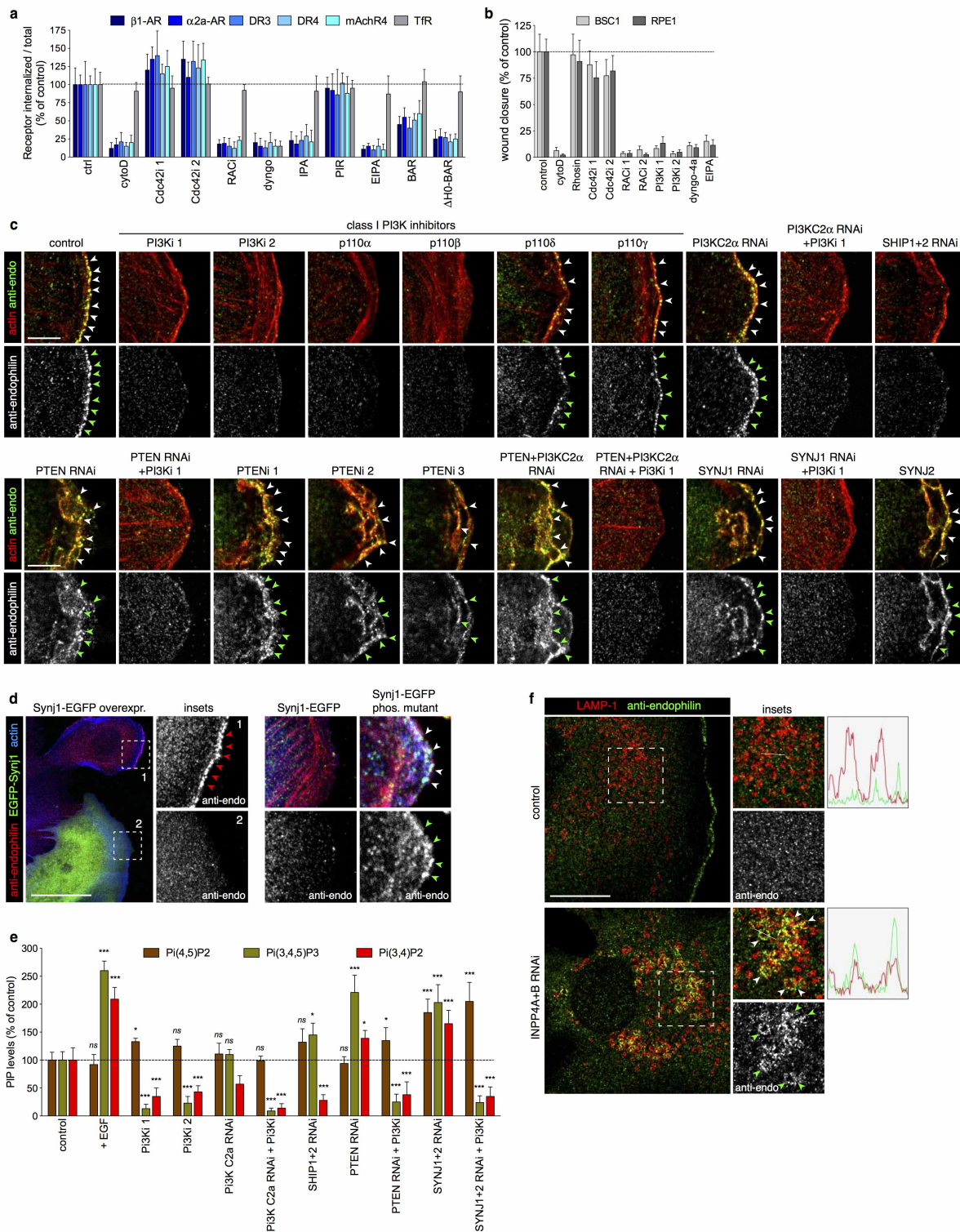
Extended Data Figure 7 | MAPK signalling and neurite outgrowth in endophilin TKD cells. Related to Fig. 2. **a**, Signals from PathScan antibody arrays reporting various intracellular signalling pathways. Intensities were normalized to the mean of the controls. Of all the signalling pathways tested endophilin TKD leads to a higher level of ERK phosphorylation (a component of the MAP kinase signalling cascade) in resting cells (mean, $n = 2$ independent experiments). **b**, Signals from PathScan antibody arrays reporting various steps within the EGFR signalling cascade. Intensities were normalized to the mean of the controls. The inset shows the level of endophilin knockdown in TKD cells. Endophilin TKD does not prevent phosphorylation of the EGFR at Y998 and thus does not account for defective endocytosis. Endophilin TKD does not prevent MEK phosphorylation on the RAF phosphorylation site (S217/S221), important for MEK activation (mean, $n = 2$ independent experiments). **c**, Immunoblots from control (C), endophilin TKD (E) or AP2 RNAi (A) cells stimulated with 5 (left) or 100 ng ml⁻¹ (right) EGF for the indicated times. Quantification of the signals from three independent experiments, normalized to the mean of the controls at $t = 0$ are shown below. As in **a** the resting pERK levels are increased in endophilin RNAi cells, probably because of an accumulation of receptors on the cell surface. At low concentrations of EGF (5 ng ml⁻¹) AP2 RNAi largely prevents MAP kinase signalling while endophilin RNAi does not (but rather an enhanced level of signalling). At higher concentrations of EGF (100 ng ml⁻¹) there is much stronger signalling at an early time point in endophilin RNAi, pointing again to the importance of this pathway in reducing basal signalling (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; *** $P < 0.001$, one-way ANOVA and Dunnett's test versus control $t = 0$). **d**, Confocal microscopy images of resting or stimulated (50 ng ml⁻¹ EGF for 10 min) cells pre-treated with endophilin TKD (3 days) or the indicated inhibitors for 30 min before stimulation and immunostained for phosphorylated ERK1/2 (pERK, red), endophilin (green) and DNA (DRAQ5, blue) (images are representatives of at least ten captures). Asterisks denote cells with strongly reduced endophilin levels. **e**, Flow cytometry analysis of phosphorylated Erk1/2 levels in resting or stimulated (50 ng ml⁻¹ EGF for 10 min) control (black) and endophilin TKD (red) cells. $n = 50,000$ cells for each conditions. **f**, Plate reader quantification of BSC1 or

RPE1 cells treated as in **d**. Thus by immunoblotting and by immunostaining there is an increase in pERK in resting conditions in endophilin RNAi cells. Note the stronger increase in basal and stimulated pERK levels in endophilin TKD cells (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **g**, Plate reader quantification of control and endophilin TKD BSC1 or RPE1 cells resting or stimulated (50 ng ml⁻¹ EGF for 30 min) and immunostained for phosphorylated Elk1, Jun or CREB (pElk1, pJun or pCREB) (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **h**, Left: confocal images (optical planes from the middle of cells) of BSC1 cells pre-treated with MEKi 1 or MEKi 2 for 30 min and stimulated with EGF (50 ng ml⁻¹, 4 min) and immunostained for endogenous endophilin-A (green) (images are representatives of six captures). Endophilin-positive puncta formation in response to growth factors is not dependent on MEK activation. Right: quantification of the number of endogenous EPAs per 400 μ m² in BSC1 or RPE1 cells pre-treated for 30 min with the indicated inhibitors and stimulated with EGF (50 ng ml⁻¹, 4 min) (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **i**, NGF stimulates endophilin-positive puncta formation in RPE1 cells. Confocal images (optical planes from the middle of cells) of an RPE1 cell treated for 4 min with NGF (10 ng ml⁻¹ for 4 min), fixed and immunostained for endogenous endophilin-A (green) (images are representatives of six captures). Cells were oriented with the leading edges (identified with phalloidin staining (actin, red)) pointing to the right. Arrowheads show internal vesicles positive for endogenous endophilin. **j**, Confocal images of cells treated with endophilin (endo TKD) or control siRNA and incubated with anti-NGFR antibodies (green) and 10 ng ml⁻¹ NGF for 10 min at 37 °C, surface stripped on ice, fixed and immunostained for endophilin (red) and actin (blue) (images are representatives of eight captures). **k**, Neurite extension assays. PC12 cells pre-treated with control or endophilin TKD were stimulated or not with 100 ng ml⁻¹ NGF for up to 6 days (images are representatives of at least 12 images). Quantifications show the percentage of cells with neurites (top left), average number of neurites per cell (top right), average neurite length (bottom left) and average neurite length per cell having neurites (bottom right) (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). Scale bars: 40 μ m (**d**), 20 μ m (**k**) and 5 μ m (**h–j**).



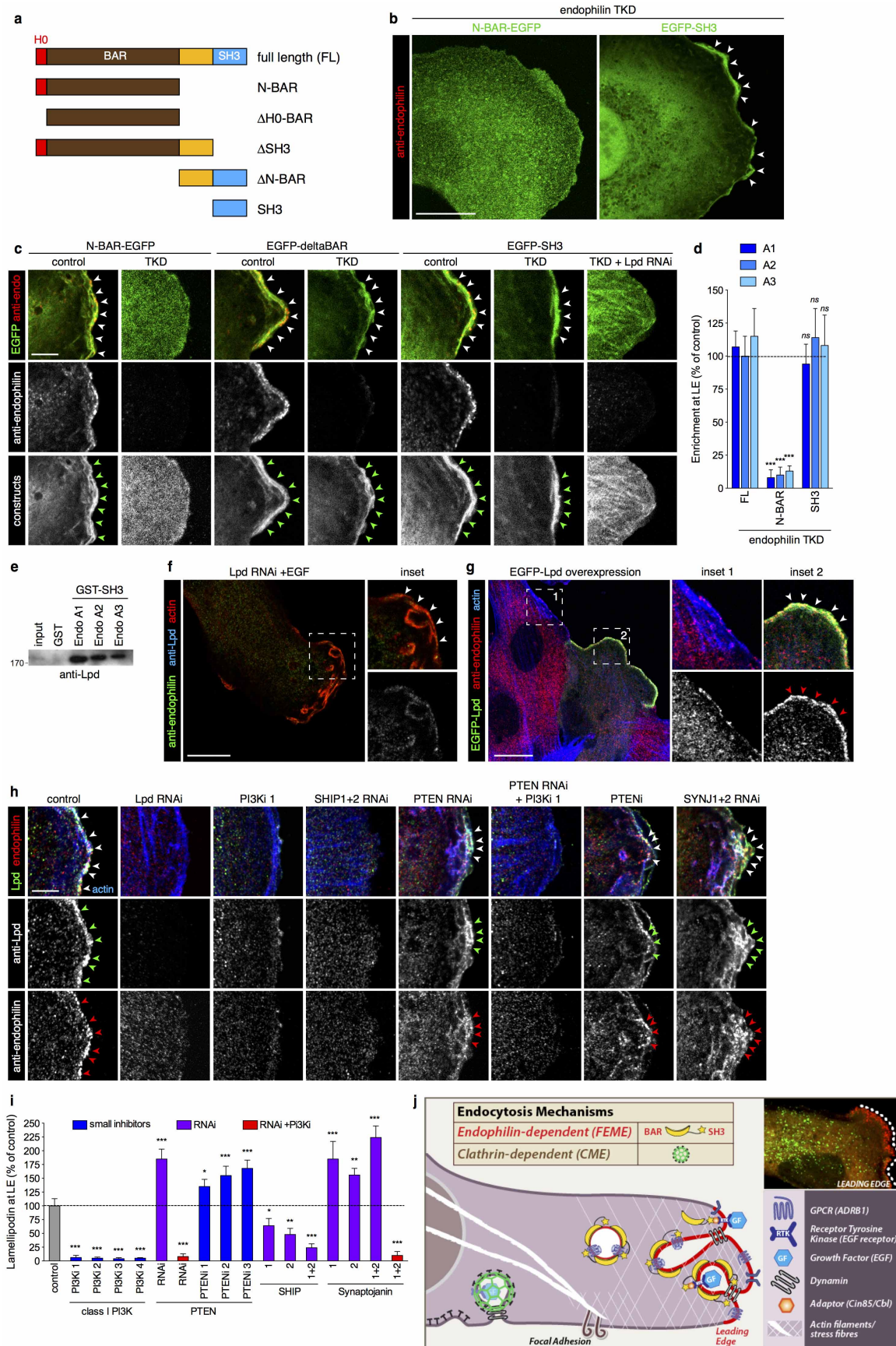
Extended Data Figure 8 | IL-2R uptake in endophilin TKD human T cells and chemical and genetic perturbations of FEME. Related to Figs 3 and 4. **a**, Confocal microscopy images (focal plane at the middle of cells) of human T cells immunostained for endogenous endophilin A (green) (images are representatives of at least ten images). Cells were either fixed directly ('resting') or 3 and 10 min after addition of IL-2 (500 pM). Scale bars, 5 μ m (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; *** $P < 0.001$, Student's t -test versus respective controls). **b**, Internalization rates of IL-2R and TfR in control, AP2 or endophilin TKD human T cells, measured by a plate reader (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; *** $P < 0.001$, Student's t -test versus respective control time points). Inset: immunoblots of cell extracts used validated endophilin TKD. **c**, Super-resolution structured illumination microscopy (SIM) images of BSC1 cells overexpressing RFP-dynamin1-T65A mutant and immunostained for endophilin (green) and clathrin (blue) (images are representatives of at least five captures). Note that there was no leading edge in the presence of this dynamin mutant, and endophilin-positive assemblies were distributed across the plasma membrane. Dynamin1-T65A

formed short tubules from the plasma membrane and at the tips of some of these tubules (arrowheads) in the boxed area (edges of cells) there were endophilin but not clathrin signals. **d**, Co-immunoprecipitation of Δ H0-BAR-EGFP with endogenous endophilin (red box, left) or with Myc-tagged overexpressed endophilin (red box, right). **e**, Flow cytometry profiles of internalized transferrin (Alexa546-labelled) in cells overexpressing increasing amounts of EGFP-AP180-DN (red) or Δ H0-BAR-EGFP (black). $n = 2,000$ cells for each condition. **f**, Confocal images of cells overexpressing the indicated mutants (blue) for 24 h or treated with the indicated inhibitors for 5 min before stimulation with 10 μ M denopamine (4 min), fixed and immunostained for endogenous endophilin-A (green) and actin (phalloidin, red) (images are representative of at least six captures). Arrowheads point to EPAs. **g**, Live-cell confocal images before and after (+30 s) the addition of indicated inhibitors to cells expressing endophilin A2-RFP (green) and clathrin (EGFP-LCa, red) or dynamin (dynamin 2-EGFP, red) (images are representatives of at least three captures from independent experiments). Arrowheads point to endophilin spots. Scale bars: 10 μ m (**a**, **c**), 5 μ m (**f**, **g**) and 1 μ m (**c**, insets).



Extended Data Figure 9 | The recruitment of endophilin at leading edges of cells requires PtdIns(3,4)P₂. Related to Fig. 5. **a**, Receptor uptake assay (HA-receptor-EGFP internalized, corrected for total levels) in cells treated with the depicted inhibitors (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **b**, Wound-closure assay. BSC1 and RPE1 cell monolayers were wounded and cell migration into the wound sites were assessed after 16 h. The inhibitors were added just after wounding (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments). **c**, Confocal images of cells treated with the indicated inhibitors or RNAi, fixed and immunostained for endogenous endophilin-A (green) and actin (phalloidin, red) (images are representative of at least six captures from three independent experiments). Arrowheads point to endophilin foci at the leading edges of cells. **d**, Confocal images of cells overexpressing the indicated constructs fixed and immunostained for endogenous endophilin-A

(red) and actin (phalloidin, blue) (images are representative of at least six captures from three independent experiments). **e**, Quantifications of PtdIns(4,5)P₂ (mocha), PtdIns(3,4)P₂ (red) or PtdIns(3,4,5)P₃ (asparagus) levels from cells treated with the indicated siRNA and PI(3)K inhibitor, immunostained for the lipids and measured using a plate reader (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; NS, non-significant; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$, one-way ANOVA and Dunnett's test versus respective control levels). **f**, Confocal images of cells treated with *INP4A* and *INP4B* or control siRNA, fixed and immunostained for endogenous endophilin-A (green) and LAMP-1 (red) (images are representative of at least six captures from three independent experiments). Intensity profiles were acquired along the indicated lines. Scale bars: 20 μ m (**d**), 10 μ m (**f**) and 5 μ m (**c**).



Extended Data Figure 10 | Lamellipodin recruits endophilin at the leading edge. Related to Fig. 5. **a**, Scheme depicting the endophilin constructs used. **b, c**, Confocal images of cells depleted for endogenous endophilin (TKD) or not (control siRNA) and expressing the indicated constructs, fixed and immunostained for endogenous endophilin to ascertain the depletion in the cells imaged (images are representatives of at least six captures from three independent experiments). **d**, Quantification of construct levels at the leading edges of cells depleted of endogenous endophilin (TKD) and expressing the indicated endophilin constructs (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; NS, non-significant; *** $P < 0.001$ one-way ANOVA and Dunnett's test versus respective full-length levels). **e**, Pull-down experiments using GST-SH3 domains of endophilin-A1, 2 or 3 (or GST as a control) with EGFP-lamellipodin. 10% of cell extract was used as 'input'. **f**, Confocal image of cell depleted for lamellipodin (lpd) and treated with 200 ng ml^{-1} EGF for 5 min to stimulate PI(3)K and induce ruffles, fixed and immunostained for endophilin (green), actin (red) and lamellipodin (blue, to ascertain the depletion) (images are representatives of at least six captures from three independent experiments). **g**, Confocal image of a cell overexpressing

EGFP-lamellipodin next to a non-transfected cell, fixed and immunostained for endophilin (red) and actin (blue) (images representatives of at least six captures from three independent experiments). **h**, Confocal images of cells treated with the indicated RNAi and inhibitors, fixed and immunostained for lamellipodin (green), endophilin (red) and actin (blue) (images representatives of at least six captures from three independent experiments). **i**, Quantification of levels of endogenous lamellipodin at the leading edges of cells treated with the indicated small inhibitors (blue), RNAi (purple), RNAi plus class I PI(3)K inhibitor ('PI3Ki', GDC-0941, 50 nM for 5 min; red) (mean $\pm$ s.e.m., $n = 3$ independent experiments; NS, non-significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ one-way ANOVA and Dunnett's test versus control). **j**, Model: endophilin-dependent (FEME) endocytosis from the leading edge. Endophilin-coated vesicles/tubules associate with receptors (after ligand binding) or receptor-adaptors (like CIN85/Cbl) via their SH3 domains, and promote membrane curvature with their N-terminal N-BAR domains. Vesicle scission is promoted by dynamin, which is also recruited by endophilin. Scale bars: 20 μm (**b, g**), 10 μm (**f**) and 5 μm (**c, h**).

Supplementary Discussion

Beyond an initial molecular description, this study provides an important molecular tool to manipulate FEME, the endophilin BAR domain, lacking the N-terminal amphipathic helix (Δ H0-BAR-GFP). This tool has no effect on CME (as measured by transferrin uptake, even at high overexpression levels), is not membrane recruited and so does not 'clog' the membrane, and has no SH3 domain to non-specifically sequester dynamin or other ubiquitous membrane trafficking components. It works by heterodimerization with endogenous endophilins causing them to localize predominantly to the cytoplasm. We recommend this tool to those who want to test if their particular receptor is internalised by the FEME pathway.

In our experiments, the FEME pathway is distinct from CME in that it shows a different dominant locus of activity, different endocytic kinetics, activation by distinct ligands and specific effects of various pharmacological tools. This does not mean that endophilin cannot be recruited into the clathrin pathway as an alternative adaptor (although a potential recruitment mechanism of endophilin into CCVs remains unclear, and its coincidence with dynamin scission does not suggest a role in cargo recruitment either). When endophilin is overexpressed it is not surprising that it can indeed be recruited into clathrin-coated vesicles, by virtue of binding to dynamin (its presence coinciding with the peak of dynamin recruitment^{S1,2}). We checked for endogenous endophilin and found a very low co-localization ($2 \pm 1\%$ of endogenous AP2 spots, $n=6$ cells), much lower than expected from endophilin overexpression data ($\sim 5\%$ on snapshot confocal images and $\sim 25\%$ of budding CCVs observed by spinning disk confocal or TIRF microscopy^{S1,2}). We observed no effect on CME of overexpression of an endophilin dominant-negative construct, and only a slight kinetic delay in TKD cells, supporting the hypothesis that endophilin functions predominantly in a non-clathrin pathway. The kinetic defect could well be significant, but could as easily arise indirectly from a reduced synaptojanin recruitment to membranes and thus an increase in $\text{Pi}(4,5)\text{P}_2$ levels^{S3,4} and thus a stronger association of coat proteins with vesicles. While our data do not exclude an involvement of endophilin in CME, they do encourage a reinterpretation of the deductions of many papers on endophilin.

Our findings that endophilin does not recognize directly the leading edge of migrating cells but instead is recruited there by lamellipodin through its SH3 domain suggest a different mechanism to the one suggested for the targeting to the lamellipodia of amphiphysin 1 and nadrin 2, for which the N-BAR domains were proposed to sense local membrane curvature⁵. As the recruitment of lamellipodin relied on the formation of $\text{Pi}(3,4)\text{P}_2$ from the dephosphorylation of $\text{Pi}(3,4,5)\text{P}_3$ by the SHIP phosphatases, it potentially links RTK and GPCR-mediated class I PI3K activation^{S6} and endophilin recruitment, possibly explaining the origin for the strict dependency of FEME on receptor activation. This data also revealed Synaptojanin and PTEN as negative regulators of the pathway.

There are many experiments in the literature that would be consistent with FEME pathway involvement, including the recent paper on ultrafast endocytosis in synapses^{S7}, that is dynamin- and actin-dependent. We have already proposed an involvement of endophilin in fast vesicle retrieval at synapses⁸ (time constant 1-2s), but this last study suggests that this time constant is even faster and this raises intriguing questions about the molecular properties that would enable endophilin to do this? Two features of endophilin potentially explain why it is ideally suited to mediate ultrafast endocytosis: first is that it is already enriched at the active zone, and in regions where synaptic vesicles are located^{S8} and second, endophilin appears to possess in one protein the functions of a cascade of proteins in CME, thus decreasing the complexity and facilitating speed.

The FEME pathway is morphologically distinct from macropinocytosis and is strictly dynamin-dependent and so is not the classical CLIC/GEEC pathway^{S9}. Caveolin, flotillin and GRAF1, proposed markers of other clathrin-independent pathways^{S10-12}, do not colocalize with endophilin and their depletion did not affect the FEME pathway. Many receptors are known to enter cells in a clathrin-independent manner but the identity of the endocytic carriers

they use is unknown^{S13}. Some of these cargoes such as GPI-anchored proteins or the nicotinic acetylcholine receptor are Cdc42-dependent and dynamin-independent, respectively^{S14,15}, and thus are not expected to use the FEME pathway.

We checked the overlap of FEME with various clathrin and macropinocytic inhibitors. An interesting finding is that inhibition of clathrin does not appear to upregulate FEME pathway activity, whereas many of the treatments that inhibit macropinocytosis also inhibit FEME (both are very sensitive to actin (de)polymerization drugs) in our model system. This does not mean that these are the same pathway as we noted that low concentrations of EGF in TKD cells can stimulate macropinocytosis from the leading edge. This latter observation might suggest a reciprocal relationship (at least for EGFR endocytosis). The need for further investigation here is also emphasized by the observation that CDC42 inhibitors cause an upregulation of FEME in response to EGF.

Given the importance of receptors being internalized by the FEME pathway one expects that it will be functionally important for many different aspects of cell signaling and responsiveness. Endophilin TKD resulted in defects in cell motility and in directional movement in fibroblasts as well as inhibition of neurite outgrowth in PC12 cells. Given that there are multiple ways for a receptor to enter a cell one is drawn to postulate distinct functions of the pathway. So far, we have only characterized the locus of activity and receptors internalized, however, this may well extend to distinct intracellular destinations and signaling signatures for the different vesicles arising from the pathway.

- S1 Perera, R. M., Zoncu, R., Lucast, L., De Camilli, P. & Toomre, D. Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19332-19337, (2006).
- S2 Taylor, M. J., Perrais, D. & Merrifield, C. J. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* **9**, e1000604, (2011).
- S3 Milosevic, I. *et al.* Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron* **72**, 587-601, (2011).
- S4 Cremona, O. *et al.* Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* **99**, 179-188 (1999).
- S5 Galic, M. *et al.* External push and internal pull forces recruit curvature-sensing N-BAR domain proteins to the plasma membrane. *Nat Cell Biol* **14**, 874-881, (2012).
- S6 Fritsch, R. & Downward, J. SnapShot: Class I PI3K isoform signaling. *Cell* **154**, 940-940 e941, (2013).
- S7 Watanabe, S. *et al.* Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* **504**, 242-247, (2013).
- S8 Llobet, A. *et al.* Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *J Neurosci* **31**, 8512-8519, (2011).
- S9 Howes, M. T. *et al.* Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol* **190**, 675-691, (2010).
- S10 Parton, R. G. & del Pozo, M. A. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 98-112, (2013).
- S11 Glebov, O. O., Bright, N. A. & Nichols, B. J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **8**, 46-54, (2006).
- S12 Lundmark, R. *et al.* The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Curr Biol* **18**, 1802-1808, (2008).
- S13 Maldonado-Baez, L., Williamson, C. & Donaldson, J. G. Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view. *Exp Cell Res* **319**, 2759-2769, (2013).
- S14 Sabharanjak, S., Sharma, P., Parton, R. G. & Mayor, S. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytic pathway. *Dev Cell* **2**, 411-423 (2002).
- S15 Kumari, S. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Biol* **181**, 1179-1193, (2008).

DYNAMIN AND ENDOPHILIN HAVE DISTINCT ORCHESTRATIONS DURING CLATHRIN-DEPENDENT AND -INDEPENDENT ENDOCYTOSIS

Laetitia Bertot^{*1}, Alexandre Grassart^{*1}, Thibault Lagache^{*2,3}, Giacomo Nardi^{*3}, Jean-Christophe Olivo-Marin³ and Nathalie Sauvonnet^{1#}

¹Unité de Pathogénie Microbienne et Moléculaire, Institut Pasteur, INSERM U1202 Paris France ²NeuroTechnology Center, Columbia University, New York, NY 10027, USA

³Unité d'Analyse d'Images Quantitative. Institut Pasteur. 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, CNRS URA2582

*These authors contributed equally to this study

Corresponding author nathalie.sauvonnet@pasteur.fr

ABSTRACT

Eukaryotic cells internalize cargos specifically through clathrin-mediated endocytosis (CME) or clathrin-independent processes (CIE). The molecular factors involved in each pathway are not well characterized especially at the dynamical level. Endophilin, a BAR domain protein, was recently shown to mark CIE processes although it has also been involved in CME. Previous in vitro studies proposed that its function is linked to dynamin during the vesicle scission. Here, we investigated the interplay of dynamin and endophilin in vivo in CME and in CIE used by Interleukin 2 Receptor (IL-2R). We performed TIRF live cell imaging on IL-2R and CrispR-gene-edited versions of clathrin light chain (CLC)-RFP, endophilin-GFP or dynamin-GFP. To identify the endocytic active tracks, we developed an unbiased robust tracking method and isolated subpopulations based on statistics and best fitting methods on tracks lifetimes. Our data show that endophilin and dynamin act at late stages in both CME and CIE. While dynamin is recruited for around 20-30s in CME, the recruitment time during IL-2R uptake is sparse. Interestingly, we observed a peak of recruitment of endophilin (20-30s) to IL-2R tracks that was not seen for CME. Furthermore, endophilin depletion decreases dynamin recruitment to CIE and in contrast to CME. However, dynamin controls the departure of endophilin in both mechanisms. These results show that these two factors does not have the same orchestration between CME and CIE. Altogether these data suggest that dynamin and endophilin have distinct actions in CME and CIE.

Key words: [dynamics](#), [internalization](#), [cytokine](#), [clathrin](#), [FEME](#), [BAR](#), [vesicle scission](#)

INTRODUCTION

Endocytosis is an essential mechanism that eukaryotic cells use to internalize nutrients, signaling factors or surface components thereby allowing important cellular functions. The

best-studied pathway is clathrin-mediated endocytosis (CME) but clathrin-independent (CIE) processes exist although much less characterized. IL-2R (β and γ) were among the first physiological examples of cargos taken up by a CIE ((Lamaze et al., 2001) ; (Sauvonnet, Dujancourt, & Dautry-Varsat, 2005); (Subtil, Hémar, & Dautry-Varsat, 1994)). These receptors can be internalized constitutively, independently of the ligand ((Hémar et al., 1995); (Subtil, Delepierre, & Dautry-Varsat, 1997)), or upon cytokine (IL-2) stimulation, leading the induction of signaling cascades promoting cell proliferation in the immune response (Gaffen, 2001). After their internalization, these cytokine receptors traffic towards lysosomes where they are degraded ((Hémar, Lieb, Subtil, DiSanto, & Dautry-Varsat, 1994); (Hémar et al., 1995); (Gesbert, Sauvonnet, & Dautry-Varsat, 2004)) and thus their endocytosis switches off the signaling pathway. The induced endocytic process is related to the Fast-Endophilin-Mediated-Endocytosis (FEME) used by other signaling receptors (EGFR, IGF1R, GPCRs like β 1-adrenergic receptors (Boucrot et al., 2015); thereby raising the general interest about this CIE mechanism. IL-2R presents the unique feature for a CIE cargo, to be internalized upon ligand induction and coupled to signalization or constitutively.

So far, around 15 factors are implicated in the uptake of IL-2R constitutively or induced ((Sauvonnet et al., 2005); (Grassart, Dujancourt, Lazarow, Dautry-Varsat, & Sauvonnet, 2008); (Grassart, Meas-Yedid, Dufour, Olivo-Marin, Dautry-Varsat, & Sauvonnet, 2010); (Basquin et al., 2013); (Basquin et al., 2015)). Some, like dynamin, endophilin, cortactin, N-WASP, actin, arp2/3 are implicated in multiple endocytic routes whereas others such as rac1, phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K), vav2, the kinases PAKs and the WAVE complex are specifically required in this route ((Sauvonnet et al., 2005); (Grassart et al., 2008); (Grassart, Meas-Yedid, Dufour, Olivo-Marin, Dautry-Varsat & Sauvonnet, 2010); (Basquin et al., 2013); (Basquin et al., 2015)).

The role of the BAR domain protein endophilin has been recently the subject of many investigations and debates ((Frost, Unger, & De Camilli, 2009); (Ferguson et al., 2009); (Meinecke et al., 2013); (Suetsugu, 2016); (Poudel et al., 2016)). Indeed, endophilin is an actor of CME that was proposed to trigger dynamin recruitment and to act on the vesicle scission ((Farsad et al., 2001); (Perera, Zoncu, Lucast, De Camilli, & Toomre, 2006); (Antonny, 2006); (Antonny et al., 2016)). Recently endophilin was also shown to be preferentially associated to CIE ((Boucrot et al., 2015); (Renard et al., 2015)) but its function is still unclear. Endophilin possesses at least three domains that might direct different functions: the recruitment of the endocytic cargo via its SH3 part (ex: β 1-adrenergic receptors, (Tang et al., 1999); (Boucrot et al., 2015)), the membrane curvature at early stage of the process via its BAR domain and the vesicle fission via its amphipathic helices. Many *in vitro* data reported all these putative roles ((Farsad et al., 2001); (Peter et al., 2004); (Gallop et al.,

2006); (Masuda et al., 2006); (Boucrot et al., 2012); (Poudel et al., 2016)), thus solely live-cell imaging of CME and CIE should bring a clearer view on endophilin function.

However, the analysis of endocytic dynamics appears to be particularly challenging. Indeed, the clathrin-coated pits (CCP) lifetimes, the only pathway for which we have some pieces of data, is very heterogeneous. Moreover, most of the analyses were done using the overexpression of the studied factors (ex: clathrin light chain (CLC), Dnm2, EndoA2) thereby probably inducing side effects. This is particularly true for BAR domain proteins that are known to induce aberrant tubulation in overexpressing cells.

In this work we investigate the orchestration of endophilin A (EndoA2) and dynamin 2 (Dnm2) in two endocytic processes: CME (CLC) and in CIE (constitutive uptake of IL-2R β). For this we engineered genome-edited cells for EndoA2-GFP, Dnm2-GFP and CLC-RFP and developed a robust image analysis software and a classification method to reveal active endocytic tracks for CME and CIE. Overall our results show that the rules governing dynamin and endophilin recruitment are different between CIE and CME and explain why EndoA2 is dispensable for CME and not for CIE.

RESULTS

Endophilin A is required for constitutive CIE of IL-2R β

IL-2R presents the advantage to be internalized upon ligand induction or constitutively. We decided to investigate the constitutive CIE route that is independent of the signaling cascade. To study the constitutive endocytosis we used Hep2 β cells, epithelial cells expressing stably only IL-2R β (Grassart et al., 2008) that are not able to transmit IL-2 signal. Endophilins were previously shown to be necessary for IL-2 induced endocytosis of IL-2R β (FEME, (Boucrot et al., 2015)), but its role in constitutive uptake has not been tested. To test this Hep2 β cells were individually depleted for EndoA2 and/or EndoA1, two isoforms expressed in Hep2 β cells, using small interfering RNAs (siRNA) (Fig. 1). We simultaneously followed the uptake of IL-2R β and transferrin (Tf) by incubating cells with fluorescent antibody against IL-2R β and fluorescent Tf for 15 minutes at 37°C (Grassart et al, 2008) (Fig. 1). We observed that the depletion of EndoA1 or EndoA2 clearly inhibited IL-2R β entry up to 50 and 60 % respectively as quantified by ICY software ((Basquin et al, 2013); (de Chaumont et al, 2012)) (Fig. 1). In contrast, EndoA1/A2 depletion has a mild effect on CME since a maximum 20% decrease was seen for Tf uptake (Fig. 1). These results show the involvement of endophilin in constitutive endocytosis of IL-2R β and confirm the preferential implication of EndoA in CIE rather than CME.

Generation of genome edited cells for EndoA2-GFP, Dnm2-GFP, CLC-RFP

Although overexpression of endocytic factors has been widely used to analyze their dynamic recruitment in CME (merrifield, danuser), this strategy was not appropriate for our study.

Indeed, our goal was to understand the interplay of dynamin and endophilin in CME as compared to CIE. Thus overexpression of one of these molecules might unbalance the protein content thereby masking the physiological effect of each actor and their coordination. Moreover, endophilin overexpression leads to a mislocalization or a massive tubulation that is not seen in control cells (Fig. S1). This side effect is very often seen when BAR domain proteins are overexpressed. So to avoid this effect, we genome-edited Hep2 β cells to express an enhanced green fluorescent protein (eGFP) tagged version of endophilin A2 (SH3GL1) by using CrispR/Cas9 strategy. We decided to use in frame fusion with inserted at the 3' end of SH3GL1 gene to obtain a C-terminal fusion to eGFP, EndoA2-GFP (Fig. 2A). GFP positive cells were sorted (by cell sorting) to obtain single-cell-derived clones that were then analyzed by PCR (Fig. 2B), western blots (Fig. 2C) and finally sequenced. A full allele-edited clone (Hep2 β -EndoA2-GFP^{EN}) was isolated and showed a normal distribution of EndoA2-GFP that was co-labeled with an anti-endophilinA2 antibody (Fig. 2D).

In addition, we also generated cells edited for dynamin 2 (Dnm2) and clathrin light chain (CLC) tagged to eGFP and RFP respectively (Doyon et al., 2011) and introduced into either Hep2 β cells or Hep2 β -EndoA2-GFP^{EN} cells. We also used a genome-edited SK-MEL-2 cell line co-expressing CLC-RFP^{EN} and DNM2-GFP^{EN} (clone Ti13; (Doyon et al., 2011).

These genome-edited cell lines allow us to avoid all troubleshooting due to overexpression and enable to quantification at single molecule level of Dnm2 and EndoA2 during CIE and CME.

Automated detection of CIE and CME sites in live cell TIRF imaging

To analyze the orchestration of Dnm2 and EndoA2 during CME and CIE, we observed the dynamics of clathrin (CLC) and IL-2R β at the plasma membrane by time lapse imaging using Total Internal Reflection Fluorescent (TIRF) microscopy using the following edited cells CLC-RFP^{EN} /Dnm2-GFP^{EN}, CLC-RFP^{EN}/EndoA2-GFP, Hep2 β -EndoA2-GFP^{EN}, Hep2 β -Dnm2-GFP^{EN}.

In genome-edited cells, fluorescent spots are faint compared to overexpressed conditions (Aguet, Antonescu, Mettlen, Schmid, & Danuser, 2013) and their high density at cell membrane renders their tracking over time difficult. In these noisy conditions, many missed or false spot detections occur, hindering the use of standard Bayesian algorithm. Indeed these algorithms use spot detections over the past n frames ($n=4$ or 5 typically) to either associate new detections to existing tracks, or create new tracks (Chenouard et al., 2014). Thus, impaired spot detections drastically impact their efficacy. In particular, it has been shown that standard tracking algorithm usually shorten endocytic tracks (Aguet et al., 2013).

Here we take advantage of the high confinement of fluorescent spots over time (Fig. 3A) to determine the positions of putative endocytic sites very precisely. We then use these positions to reconstruct endocytic tracks robustly. To determine the positions of putative endocytic sites,

we first denoise live TIRF images by applying a wavelet transform to images and thresholding statistically wavelet coefficients to remove noise and detect bright fluorescent spots (implement in *Spot Detector* plugin in Icy ((de Chaumont et al., 2012) (<http://icy.bioimageanalysis.org>)) (Fig. 3B). We then sum denoised images that contain spots that are significantly brighter than background and obtain an elevation map of the whole time process (Fig.3B) In this elevation map, the putative endocytic sites appear as high intensity Gaussian peaks due to the numerous spots detections that are summed along each endocytic track. In particular, highest peaks correspond to long-lasting and/or bright tracks. We then precisely localize putative endocytic sites by detecting peak positions with local maxima algorithm. With the obtained positions we can reconstruct global tracks by associating detected spots in each frame to closest Gaussian peak (Fig. 3B). In addition, the unambiguous localization of putative endocytic sites allows us to reconstruct the full intensity profile of each track even when multiple detections are missing (Fig. 3B). Our method is implemented in Icy and publicly available (plugin eTrack). We compared eTrack to state of the art Bayesian tracking algorithm (enhanced Multiple Hypothesis Tracking (eMHT) method (Chenouard et al., 2013), (Chenouard et al., 2014)) and observed that shortest tracks (<40 seconds)) was diminished by 30% with eTrack (42% of the tracks) compared to eMHT (54.8% of tracks) for clathrin, and was similar (61%) for IL-2R (Fig. S2). We also observed that the number of tracks with a large total displacement (>0.5 μ m), which shall correspond to tracks with false step by step associations leading to artefactual spot motion, was drastically diminished with eTrack (3.0% for clathrin and 3.5% for IL-2R) compared to Bayesian tracking (9.8% for clathrin and 7.8% for IL-2R) (Fig. S2). We thus conclude that tracks obtained with eTrack are much confined and longer than tracks obtained with state-of-the-art Bayesian methods, which better corresponds to confined and long-lasting endocytosis process (Fig. S2). Finally our tracking method associated to the co-localization track processor (eTrack) allowed the identification of a bank of CLC and IL-2R tracks co-localized or not with either Dnm2 or EndoA2.

Identification of active CLC and IL-2R tracks by best fitting methods

The endocytosis process is very heterogeneous, therefore to study the recruitment of factors involved in the pathway it is necessary to isolate tracks that are truly internalized called active tracks. To identify in an unbiased way active endocytic tracks for CME and CIE, we used a statistical approach on the lifetime distributions of CLC and IL-2R tracks.

To test the relevance of our strategy we first focused on CME since the dynamic of this pathway has been better characterized ((Loerke et al., 2009), (Aguet, Antonescu, Mettlen, Schmid, & Danuser, 2013), (Hong, Cortesio, & Drubin, 2015)). We assumed that CLC tracks should have the same dynamic in both cellular contexts (CLC-RFP^{EN} /Dnm2-GFP^{EN} and CLC-RFP^{EN}/EndoA2-GFP), which was indeed seen on the lifetime distributions (Fig. 4A, C). Thus,

we pooled the corresponding sets of tracks in order to increase the number of data in each case co-localized with either Dnm2 or EndoA2 and non-co-localized ones.

Lifetimes of CLC tracks non-co-localized follow an exponential distribution (Fig. 4, S3). This reveals short-lived CLC tracks at the plasma membrane. These tracks might account for aberrant detection and/or non-productive clathrin assembly at the plasma membrane. Concerning co-localized tracks, there is a proportion of tracks following an exponential distribution like non-co-localized ones (Fig. 4). Altogether these tracks having an exponential distribution should represent the previously defined early/late abortive tracks (Loerke et al., 2009). Since CLC co-localized tracks with either Dnm2 or EndoA2 were not following only the exponential distribution, we tested statistically the number of Gaussian distributions by the Bayesian Information Criterion (BIC). The BIC result was in this case 4 (Fig. S3). These 4 Gaussian distributions should represent different CLC populations. Thus, we fitted CLC lifetimes of by a mixture model defined by the sum of an exponential distribution and 4 Gaussian distributions. Thus, CLC-Dnm2 and CLC-EndoA2 co-localized tracks follow a mixture of exponential distribution (36% of tracks) and 4 Gaussian distributions: Pop1=90s (+/-30s, 30% of tracks), Pop2=154s (+/- 33s, 20% of tracks), Pop3=236s (+/- 20s, 7% of tracks) and Pop4=294s (+/- 10s, 7% of tracks) (Fig. 4A, C).

As dynamin is an essential factor of CME, we analyzed how its depletion influence the process and affect CLC populations. Thus, CLC-RFP^{EN}/EndoA2-GFP cells were treated with siRNA targeting Dnm2 and CLC tracks were analyzed as previously, with a fitting method having one exponential and 4 Gaussians. Strikingly, the depletion of dynamin2 in CLC-RFP^{EN}/EndoA2-GFP cells led to a different CLC lifetime distributions (Fig. 4D). Indeed, we observed a shift in the first population that overlaps almost completely with the second population, thus giving a distribution with 3 different Gaussians instead of 4 in the control condition (Fig. 4D). Since dynamin2 is absolutely required in CME, this result reveals that the population 1 (mean at 90s) represents the active endocytic CLC tracks. In contrast, populations 3 and 4 are static CLC tracks that are not internalized during almost all the movies time (300s). These populations would be particularly enriched in clathrin lattice objects. Population 2 might represent a mixture of late productive CLC tracks in which the process would be delayed in addition to non-productive tracks that would be finally abortive. These data reveal that the tracking and fitting methods used to identify CLC subpopulations and especially active tracks gave robust results. Next we focused on CIE by analyzing IL-2R tracks. Similarly to CME, we observed that non-co-localized IL-2R tracks have the same lifetime distribution fitting with an exponential (Fig. 5). These short-lived tracks might represent aberrant tracks (miss-tracked objects or non-specific antibody labeled tracks) or non-productive endocytic tracks. Dyn2-IL-2R and EndoA2-IL-2R co-localized tracks follow a similar lifetime distribution fitting partly with the exponential (Fig. 5A, C). We applied the same mixture fitting method used on CME this time to identify active CIE tracks from co-localized tracks lifetimes. The best fitting for these distributions was

obtained with an exponential (60% of tracks) and 2 Gaussians populations: Pop1=135s (+/- 50s, 40% of tracks) and Pop2= 590s (+/- 10s, 2% of tracks) (Fig. 5A, C). While the population 2 represents static tracks of IL-2R that are not internalized, the first Gaussian population might be the active CIE endocytic tracks. Coherently, the depletion of dynamin 2 (Hep2 β -EndoA2-GFP^{EN} siDnm2) led to a very different distribution of EndoA-IL-2R co-localized tracks (Fig. 5D). Indeed, the fitting of these lifetimes distribution with an exponential and 2 Gaussians revealed the suppression of the population 1 (mean at 135s) that is shifted towards the exponential curve, whereas the population 2 (mean at 590s) is still observed and even enriched (11% of tracks, Fig. 5D). This result confirmed the importance of dynamin in IL-2R uptake and reinforced our identification method to identify the active CIE endocytic tracks. Noteworthy, the depletion of endophilin by siRNA introduction either in CLC-RFP^{EN} /Dnm2-GFP^{EN} cells or in Hep2 β -Dnm2-GFP^{EN} cells did not affect strongly the distribution of the CLC or IL-2R populations (Fig. 4B, 5B). This result is in quite agreement with the weaker effect of endophilin depletion in CME and CIE in contrast to dynamin depletion. Altogether our tracking method and our statistical analyses allow the identification of unbiased active CME (mean of 90s) and CIE tracks (mean of 135s).

Different recruitment of Dnm2 and EndoA2 in CME compared to CIE

To understand the role of dynamin and endophilin in CME and CIE, we analyzed their recruitment by subpopulations identified for each pathway (Fig. 4, 5). First, we quantified the co-localization rate between CLC or IL-2R and Dnm2 or EndoA2 in our 4 cellular conditions (depleted or not for Dnm2 or EndoA2, Fig. S6). For CLC tracks in populations 1 to 4, we observed around 80% of co-localization with Dnm2 and 75% in cells depleted for EndoA2 (Fig. 6). This reveals that in CME, endophilin is not required to recruit Dnm2. However, we observed 70% of CLC tracks co-localized with EndoA2 (Fig. 6). Strikingly this co-localization rate was enhanced when Dnm2 was depleted (94% of co-localized CLC-EndoA2 tracks, Fig. 6). This result shows that the depletion of dynamin modifies the recruitment of endophilin to CLC tracks. For CIE we saw that 60% of IL-2R tracks (in population 1+2) were co-localized with Dnm2 (Fig. 6). Strikingly, this rate was reduced to 40% upon EndoA2 depletion (Fig. 6), showing that endophilin is required for efficient dynamin recruitment to CIE. In addition, we saw that 36% of IL-2R tracks co-localized with endophilin and this rate was not affected in the absence of Dnm2 (Fig. 6). Thus in CME, endophilin is very often associated to CLC tracks but it is not necessary for the recruitment of dynamin. In contrast in CIE, endophilin is less localized to IL-2R tracks but it is required for a complete Dnm2 recruitment.

Orchestration of dynamin and endophilin in CME and CIE

To better understand the role of dynamin and endophilin in CME and CIE, we analyzed their orchestration by determining the duration and time of co-localization in each CLC or IL-2R

subpopulation. In CME, the lifetime of dynamin co-localization was depending on the populations. In the population 1, we found a precise duration of interaction with a peak at 24 s (± 10 s, Fig. 7). This lifetime distribution was much sparser (uniformly distributed) in the other CLC populations (Fig. S4) with a mean time increasing with CLC lifetimes (pop2=60s, pop3=130s, pop4=167s). This more uniform distribution might be due to multiple co-localization per CLC track (> 80% multicolocalization in population 2, 3, 4 for only 50% in population 1, Fig. S5). We observed the same distribution of co-localization duration of Dnm2 in cells depleted for endophilin (20 s in Pop1 of CLC-RFP^{EN} /DNM2-GFP^{EN} siEndoA2, Fig. 7). This result demonstrates that EndoA2 does not affect the duration of Dnm2 recruitment to CME. In comparison to CME, in CIE dynamin was recruited during a much sparser duration to IL-2R tracks (Fig. 7). In the active IL-2R tracks (Pop1), we observed that Dnm2 recruitment was during between 20 to 60s (Fig. 7). The depletion of endophilin (Hep2 β -Dnm2-GFP^{EN} siEndoA2) did not affect significantly the duration of dynamin interaction to IL-2R tracks (Fig. 7). Thus, endophilin does not affect the duration of Dnm2 recruitment, only the efficiency of co-localization in CIE. Altogether these data show that dynamin has a precise time of action in CME in contrast to CIE where its recruitment seems more stochastic. Interestingly, we observed an opposite recruitment profile of endophilin than dynamin. Indeed, EndoA2 was mostly interacting precisely in CIE since it is recruited for 20-30 s to IL-2R active tracks (Pop1, Fig. 7). This duration was more variable in the static tracks of IL-2R from Pop2 (Fig. S4). The depletion of dynamin 2 led to a longer and randomized duration of interaction of EndoA2 to IL-2R tracks than in control cells (Fig. 7). Thus, in CIE endophilin has a quite precise duration of action that is regulated by dynamin. In contrast in CME, the duration of EndoA2 interaction to CLC active tracks was sparser, lasting between 10 to 50 s (Fig. 7). Again, the depletion of dynamin led to a slight increase in the duration of endophilin co-localized to CLC tracks (Fig. 7). Therefore, in both CME and CIE dynamin regulates the interaction duration of endophilin. Next question was to determine when endophilin and dynamin were recruited during CME and CIE. To do so we analyzed the interaction time of each protein (Dnm2 and EndoA2) in proportion to the length of the track (CLC or IL-2R). Dynamin and endophilin stayed mainly until the end of CLC or IL-2R active tracks in any cellular conditions (siC, siEndoA2 or siDnm2, Fig. 8). In most of CLC or IL-2R tracks we observed that Dnm2 or EndoA2 was leaving at 85-100% of the track lifetime (Fig. 8). The relative intensity profiles of CLC and IL-2R tracks co-localized with Dnm2 or EndoA2 confirmed the involvement of these two factors at the end of active tracks (Fig. 9). However, a closer comparison at dynamin time of departure in CME and CIE showed some differences. Indeed, for CIE, beside the peak of final time of interaction at the extreme end of track, we also observed part of Dnm2 recruitment randomized on IL-2R lifetimes. This last point suggests that dynamin may have also an action earlier during the

endocytic process. Anyhow these data confirm the importance of these factors in the last stage of the endocytic process: the vesicle scission.

DISCUSSION

Our study by combining non-Bayesian tracking method, not based on a priori assumption, with statistical classification allows the identification of active CIE and CME endocytic tracks. Recently, Aguet et al. proposed a *Master-Slave* approach where an over-expressed, bright molecule that is very stable all along the endocytosis process is used as a *Master* channel and helps to determine the positions of endocytic events unambiguously (Aguet et al., 2013). Then, the *Slave* molecule of interest, which is in physiological concentrations (genome-edited cells) and much less bright than over-expressed *Master* signal can be robustly tracked at pit position along the *Master* track. The main issue with Aguet's method is that it requires a specific fluorescent channel for Master's tracking, which complicates experimental settings and decreases the number of available fluorescent channels when labeling and tracking multiple molecules implicated in the endocytosis process. Our method does not need any additional channel to detect active endocytic tracks.

Our work indicates a difference in the lifetime of CME (90s) in comparison to CIE (135s). This result is in accordance with previous studies on cargos entry that is for instance faster for Tf (CME) than for IL-2R uptake (CIE) (Basquin et al., 2013). Thus, we are confident in our tracking classification of CME and CIE. In CME beside the active population (30% of the tracks), we obtained other populations that can be further classified in 3 main classes: the early/late abortive (very short tracks fitting with exponential distribution, 35%), late active tracks (Gaussian of population 2, 20%) and static tracks not internalized fully (Gaussian of populations 3 and 4, 15%). This result is quite in agreement with previous studies except for the static population (Aguet et al., 2013); (Loerke et al., 2009) and (Hong, Cortesio, & Drubin, 2015)). This is perhaps due to the fact that previous studies often excluded long static CLC tracks by performing TIRF acquisitions for maximum 150s, in contrast to 300s in our present work.

Anyhow, our classification method enables the analysis of the orchestration of different implicated factors among the track category. In particular, our work compares the recruitment of dynamin and endophilin between CME and CIE and reveals their specific behavior depending on the pathway. Both proteins are recruited at the end of each endocytic mechanism, confirming their importance in the last stage, the vesicle fission.

However, dynamin has a precise time and duration of action in CME that is not really observed in CIE. This might reveal that dynamin in CIE have an action that is not only restricted to the scission. Indeed, dynamin is known to interact with several actin regulators. During CIE we know that N-WASP is recruited via dynamin to IL-2R tracks (Basquin et al., 2015). Thus in the

case of CIE, dynamin would act as an actin recruiter and thus would be more uniformly associated during the process.

Strikingly our work points that endophilin is required for the efficient recruitment of dynamin to IL-2R active tracks in contrast to CME. This last result is in total agreement with the fact that EndoA is dispensable for CME and not for CIE (Boucrot et al., 2015 and our study). Several arguments can explain this difference of dynamin recruitment in CME versus CIE. Indeed, in CME many BAR domain proteins have been implicated and thus they might have redundant action. In particular N-BAR proteins can bind the lipid bilayer (via BAR domain), can curve membrane (BAR and amphipathic helix) and also interact directly with dynamin (via SH3). Thus these proteins are proposed to act as a template for dynamin at the neck of clathrin vesicle (Sundborger F10000Prime report 2014). Amphiphysin is the closest counterpart to endophilin function that is necessary for CME. Moreover, *in vitro* data recently proposed that both proteins cooperate to recruit dynamin to clathrin coated pit (Meinecke et al., 2013). Beside the redundancy of BAR proteins, the assembly of clathrin coat that gives a precise structure to the pit/vesicle can provide enough tension to form a neck thin enough to recruit dynamin without the action of other proteins like endophilin. So far in CIE used by IL-2R, endophilins are the only BAR domain proteins involved thereby providing an explanation for their importance in these endocytic processes.

Now a puzzling result is that we observed 70% of CLC active tracks co-localized with EndoA2 whereas this rate dropped to 36% for IL-2R in CIE although endophilin is more necessary for this last pathway. This suggests that CIE of IL-2R is a quite inefficient process in comparison to CME. Perhaps, CME and all scaffolding proteins involved in, are very efficient in recruiting endophilin in contrast to CIE. One can even propose that endophilin is in limiting amount that would be titrated by the high amount of clathrin lattices, enriched in EndoA2 and Dnm2 (Fig. S). Therefore, the CME would saturate the endophilin pool accessible to other mechanism like the uptake of IL-2R. This raises a general issue on the regulation of quantities of common actors protein involved in CME and CIE.

MATERIAL AND METHODS

Plasmid design, construction and siRNA

For the edition of Endophilin A2 (Gene ID: 6455 du 1/02/2015 GRCH 38 NC SH3GL1 Primary assembly, isoform 1: NM_003025.3, Chr 19), we used the following website www.genome-engineering.org/crispr de Zhang, MIT 2013, (Hsu et al, Nature biotechnology, 2013) to design CRISPR sequences. We digested the *Streptococcus pyogenes* Cas9 plasmid called pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459, Adgene plasmid 48139) using BbsI. The two CRISPR (suspended in water DNase/Rnase free from GIBCO at dilution 100 µM) were hybridized (CRISPR 1: CACCGCACGGGTGAGTCACTGCGGC; CRISPR 2: AAACGCCGCAGTGACTACCCGTGC) and the plasmid recirculated with T4 ligase in Tango

(universal tampon). The donor plasmid was performed using the Gibson assembly protocol and contains the gene of interest sequence followed by a linker (replacing the initial STOP codon), then the GFP sequence ending by a STOP codon.

The siRNA Dnm2 (GCAGCUCAUCUUCUCAAATT, Qiagen) and endophilin A2 smart pool (GCAAGGCGCUGUACGACUU, CAACUUUGGUGACGCAUUG, GCCCUAAGCGGGAGUAUAA, GCAGAAACCAGCCAUGCACA, Thermo scientific Dharmacon, Cat # L-019852-00) were used at 10nM. In parallel, siRNA control, ON - TARGET plus control (UGGUUUACAUGUCGACUAA, from Thermo Scientific Dharmacon) was transfected in cells by lipofectamine RNAiMax.

Cell culture conditions, DNA transfections and cell sorting

As described previously (grassart et al, 2008), Hep2 cell stably expressing the β chain of interleukin 2 receptor were grown in DMEM (10% FBS and 1mg/ μ l of G418 to maintain the β chain expression), was purchased in GIBCO. For SK-MEL-2 cell lines, they were cultured in DMEM/F12 medium from Invitrogen where 10% FBS (GIBCO) were added.

For gene editing, Hep2 β cells and SK-MEL-2 Clc^{EN}-RFP were transfected using AMAXA nucleofactor by co-transfection of 1.5 μ g of CRISPR plasmid and 15 μ g of donor plasmid in 82 μ l of solution named R and 18 μ l of Solution supplement 1 (Lonza).

Briefly, siRNAs were transfected at 10 nM using lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) and cells analyzed 72h after transfection.

DNA extraction and sequencing

3 x 10⁶ cells Hep2 β edited clones were detached using trypsin/EDTA (0.05%, Life technologies) and re-suspended in DMEM with 10% FBS. The cells were then centrifuged and homogenized with the solution of Qiagen DNA extract kit and the genomic DNA was extracted according to the manufacturer's protocol. The human endophilin A2 (SH3GL1) locus was PCR amplified from 200 ng of genomic DNA using a high fidelity polymerase, Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and the following primers CAGGTCACAGCAGGTGTGGAG and CTGCTCAGGGAGTACCTCAAG to check for positive clones. The CRISPR, donor plasmid and gene edited clones were sequenced by Eurofins facilities.

Endocytosis by immunofluorescence

Hep2 β cells were treated or not with siRNA targeting endophilin A2 or dynamin 2 (or control siRNA). Three days after transfection, an IL-2R and Tf uptake assay was performed. In order to follow the IL-2R endocytosis, a specific antibody recognizing the extracellular part of the receptor (subtil et al, 1994)) was coupled with a fluorolink Cy3 (called 561-Cy3, stock at 0.83 mg/ml) for immunofluorescence. For uptake assay, 561-Cy3 was used at dilution 1/1000. The

internalization of transferrin receptor was performed using an Alexa fluor 488 coupled to the transferrin ligand (Tf-A488, stock at 5mg/ml, Invitrogen). A 15 minutes uptake of 561-Cy3 and Tf-A488 was done according to the described protocol (grassart et al, 2010), the cells were fixed using 4% PFA +4% sucrose and stained with a cell boundary marker named HCS Cell Mask Alexa Fluor 350 (Invitrogen Molecular Probes, 1.25 ng/ml). Images were taken with a 20x objective from at least 3 independent experiments corresponding to at least 100 cells. The quantification were performed help by ICY software with the following complementary modules “HK-Means, Active Contours, Spots detector and HCS quantification” (Grassart et al, 2010; Basquin et al, 2013).

TIRF microscopy

Hep2 β Dnm2^{EN} (GFP), Hep2 β Endophilin A2^{EN} (GFP), SK-MEL-2 Dnm2^{EN}(GFP) / CLC^{EN} (RFP), Hep2 β Endophilin A2^{EN} (GFP) / CLC^{EN} (RFP) depleted or not for either dynamin 2 or endophilin A2 were plated with 3×10^5 cells on MatTek plates (MatTek Corporation).

To observe IL-2R β , cells were incubated 2 minutes at 37°C with 561 - Cy3 antibody in a DMEM (Hep2 β cells) or DMEM/F12 (for SK-MEL-2), both red phenol free (GIBCO) was done and the cell washed before incubation in an environmental control system set to 37°C. Movies were taken at frequency 0.5 Hz during 600 s for IL-2R endocytosis and 300 s for clathrin using a TIRF microscope (IX81F - 3, Olympus) as described ((basquin, 2013); (Basquin et al., 2015)). Briefly, 20 to 30 cells were acquired corresponding to at least 5000 total tracks for each condition.

Western blot analysis and antibodies

Cells were incubated in Laemeli 5X solution and boiled 5 minutes at 100°C, loaded on SDS-PAGE gel and transferred in nitrocellulose membrane for western blotting. Then, primary antibodies recognizing specifically Endophilin A2 (H-60): sc-25495 (Santa Cruz, rabbit, 1/500), Dynamine 2 (Sigma-Aldrich, mouse, 1/500), GFP (Santa Cruz, rabbit, 1/500) and flotillin 2 (loading control, transduction laboratories, mouse, 1/2000) and secondary antibodies Horse Radisch Peroxidase (HRP) linked to anti-mouse or rabbit (GE Healthcare, for ECL detections) and alkaline phosphatase (AP) linked to anti mouse or rabbit (for ECF allowing quantitative analysis by Storm FluorImager) were used.

Image analysis, tracking and co-localization

The detection of the fluorescent spots was performed by ICY software, an open-source image analysis available online at <http://icy.bioimageanalysis.org> (de Chaumont et al., 2012). Fluorescent spots were detected using the wavelet-based detection algorithm (Spot Detector, ref). Detections of spots upon time draw tube tracks that we can obtain for each channel a set of tracks. We used some parameters to define a good signal to noise ratio (threshold 40). We

take into account the movement of the membrane and degree of liberty of the protein tracked. To avoid mistracking, we set a distance of 10 pixels around the position determined by the projection of the stack upon time. If two detections are close enough to be in this area, the closest one is considered as the good one. In addition, a gap tolerance of 10 seconds is used in order to compensate potential membrane fluctuation or brief loss of focus. The minimum lengths selected for the study were 10 and 20 seconds for clathrin and IL-2R tracks respectively. Then, we isolated co-localized tracks with less than 5 pixels between the barycenter of each tube tracks and extract the position, the intensity profiles, the time of initiation/end of recruitment and the duration of tracks implemented as a plug-in module named eTrack in ICY (Basquin et al., 2015).

Intensity profile corresponds to the intensity of fluorescence of the tracks with 5 frames before and after and normalized by the max intensity of the considered tracks and plotted into Excel to draw the graphs.

Statistical analysis of CME and CIE endocytic tracks

As the CLC-lifetimes in the control cases are supposed to follow the same distribution, we pooled the corresponding sets of tracks, in both co-localization and non-co-localization cases, in order to increase the number of data. We obtained 8521 co-localized tracks (CLC-siC-coloc) and 9294 non-co-localized ones (CLC-siC-non-coloc). Afterwards, we eliminated from each lifetimes data set (CLC-siC-coloc, CLC-siC-non-coloc, EndoA2-CLC-siDnm2-coloc, Dnm2-CLC-siEndo-coloc), all the tracks with length smaller than 290s and either starting at 1s or ending at 300s. Moreover, in the data sets of co-localized tracks, we also eliminated all the tracks with co-localization duration with the protein equal to 1s. Then, we get 4353 tracks in CLC-siC-coloc and 6931 tracks in CLC-siC-non-coloc. In the EndoA2-CLC-siDnm2-coloc and Dnm2-CLC-siEndoA2-coloc data sets the number of tracks fall from 6931 to 3761 and from 4671 to 2353, respectively. By previous operations we potentially lose any knowledge about short tracks in each data set. Now, instead of consider that the relative frequency of these

tracks is zero and fit the data on the interval [1,300], we preferred to fit each data set on [10, 300]. The CLC-siC-non-coloc data set follows an exponential distribution

$$\text{Exp}(x, \lambda) = \lambda e^{-\lambda x}$$

In order to define different CLC populations we fit the data set with the following mixture model

$$F(x, \theta) = p_0 \text{Exp}(x, \gamma) + \sum_{i=1}^N p_i \mathcal{N}(x, \mu_i, \sigma_i), \quad \sum_{i=0}^N p_i = 1$$

where

$$\mathcal{N}(x, \mu_i, \sigma_i) = \frac{1}{\sigma_i \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x - \mu_i)^2}{2\sigma_i^2}}$$

represents the Gaussian distribution corresponding to the i^{th} population and

$$\theta = (\lambda, \mu_1, \sigma_1, \dots, \mu_N, \sigma_N)$$

denotes the set of parameters of the model.

The $(2N+1)$ parameters are estimated by the maximum likelihood estimation method implemented by using the expectation-maximization algorithm. The number of Gaussian

distributions is chosen by performing the BIC test (see Fig. S3) which selects the model which minimizes the following function

$$\text{BIC}(N) = -2\ln(L(F(x, \hat{\theta}))) + \ln(K)N$$

where K is the number of data and

$$L(F(x, \hat{\theta})) = \prod_{i=1}^N F(x_i, \hat{\theta})$$

denotes the likelihood of the model F evaluated with the set of parameters maximizing it. The BIC function is minimized by N=4 which means that we can define 4 CLC populations for the lifetimes of co-localized tracks. The parameters of the selected model are the following:

$$(p_0, p_i) = (0.4759, 0.1885, 0.2190, 0.0643, 0.0522), \quad \lambda = 0.04$$

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank PH Commere from the sorting facility of Institut Pasteur, S Dallongeville for debugging and V Malardé for technical support. We also thank E. Boucrot for reagents and discussion. TL and AG were funded by a Roux post-doctoral fellowship from Institut Pasteur and TL partially supported by LABEX IBEID. LB was funded by the university Paris Sud/Saclay, ED SDSV.

REFERENCES

- Aguet, F., Antonescu, C. N., Mettlen, M., Schmid, S. L., & Danuser, G. (2013). Advances in Analysis of Low Signal-to-Noise Images Link Dynamin and AP2 to the Functions of an Endocytic Checkpoint. *Developmental Cell*, 26(3), 279–291. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.019>
- Antonny, B. (2006). Membrane deformation by protein coats. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(4), 386–394. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.06.003>
- Antonny, B., Burd, C., De Camilli, P., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., et al. (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *The EMBO Journal*, e201694613. <http://doi.org/10.15252/embj.201694613>
- Basquin, C., Malarde, V., Mellor, P., Anderson, D. H., Meas-Yedid, V., Olivo-Marin, J. C., et al. (2013). The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent

dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *Journal of Cell Science*, 126(5), 1099–1108. <http://doi.org/10.1242/jcs.110932>

Basquin, C., Trichet, M., Vihinen, H., Malardé, V., Lagache, T., Ripoll, L., et al. (2015). Membrane protrusion powers clathrin-independent endocytosis of interleukin-2 receptor. *Embo Journal*, 34(16), 2147–2161. <http://doi.org/10.15252/emboj.201490788>

Boucrot, E., Ferreira, A. P. A., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., et al. (2015). Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*, 517(7535), 460–465. <http://doi.org/10.1038/nature14067>

Boucrot, E., Pick, A., Camdere, G., Liska, N., Evergren, E., McMahon, H. T., & Kozlov, M. M. (2012). Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell*, 149(1), 124–136.

Chenouard, N., Bloch, I., Olivo-Marin, J. C. (2013). Multiple hypothesis tracking for cluttered biological image sequences. *IEEE Trans Pattern Anal Intell*, 35 (11) : 2736 - 3750. <http://doi.org/10.1109/TPAMI.2013.97>

Chenouard, N., Smal, I., de Chaumont, F., Maška, M., Sbalzarini, I. F., Gong, Y., et al. (2014). Objective comparison of particle tracking methods. *Nature Methods*, 11(3), 281–289. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2808>

de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Herve, N., Pop, S., Provoost, T., et al. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods*, 9(7), 690–696. <http://doi.org/10.1038/NMETH.2075>

Doyon, J. B., Zeitler, B., Cheng, J., Cheng, A. T., Cherone, J. M., Santiago, Y., et al. (2011). Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nature Cell Biology*, 13(3), 331–337. <http://doi.org/10.1038/ncb2175>

Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., & Pietro De Camilli. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *The Journal of Cell ...*, 155(2), 193–200. <http://doi.org/10.1083/jcb.200107075>

Ferguson, S., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., et al. (2009). Coordinated Actions of Actin and BAR Proteins Upstream of Dynamin at Endocytic Clathrin-Coated Pits. *Developmental Cell*, 17(6), 811–822. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.005>

Frost, A., Unger, V. M., & De Camilli, P. (2009). The BAR Domain Superfamily: Membrane-Molding Macromolecules. *Cell*, 137(2), 191–196. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.010>

Gaffen, S. L. (2001). SIGNALING DOMAINS OF THE INTERLEUKIN 2 RECEPTOR. *Cytokine*, 14(2), 63–77. <http://doi.org/10.1006/cyto.2001.0862>

Gallop, J. L. J., Jao, C. C. C., Kent, H. M. H., Butler, P. J. G. P., Evans, P. R. P., Langen, R. R., & McMahon, H. T. H. (2006). Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *The EMBO Journal*, 25(12), 2898–2910. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601174>

- Gesbert, F., Sauvonnnet, N., & Dautry-Varsat, A. (2004). Clathrin-Independent endocytosis and signalling of interleukin 2 receptors IL-2R endocytosis and signalling. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 286, 119–148.
- Grassart, A., Dujeancourt, A., Lazarow, P. B., Dautry-Varsat, A., & Sauvonnnet, N. (2008). Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO Reports*, 9(4), 356–362. <http://doi.org/10.1038/embor.2008.28>
- Grassart, A., Meas-Yedid, V., Dufour, A., Olivo-Marin, J.-C., Dautry-Varsat, A., & Sauvonnnet, N. (2010). Pak1 phosphorylation enhances cortactin-N-WASP interaction in clathrin-caveolin-independent endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(8), 1079–1091. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01075.x>
- Hémar, A., Lieb, M., Subtil, A., DiSanto, J. P., & 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*, 24(9), 1951–1955. <http://doi.org/10.1002/eji.1830240902>
- Hémar, A., Subtil, A., Lieb, M., Morelon, E., Hellio, R., & Dautry-Varsat, A. (1995). Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor alpha, beta, and gamma chains. *The Journal of Cell Biology*, 129(1), 55–64. <http://doi.org/10.1083/jcb.129.1.55>
- Hong, S. H., Cortesio, C. L., & Drubin, D. G. (2015). Machine-Learning-Based Analysis in Genome-Edited Cells Reveals the Efficiency of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Cell Reports*, 12(12), 2121–2130. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.048>
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C. G., Benmerah, A., & Dautry-Varsat, A. (2001). Interleukin 2 Receptors and Detergent-Resistant Membrane Domains Define a Clathrin-Independent Endocytic Pathway. *Molecular Cell*, 7(3), 661–671. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00212-X](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00212-X)
- Loerke, D., Mettlen, M., Yarar, D., Jaqaman, K., Jaqaman, H., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2009). Cargo and dynamin regulate clathrin-coated pit maturation. *PLoS Biology*, 7(3), e57. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000057>
- Masuda, M. M., Takeda, S. S., Sone, M. M., Ohki, T. T., Mori, H. H., Kamioka, Y. Y., & Mochizuki, N. N. (2006). Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms : Abstract : The EMBO Journal. *The EMBO Journal*, 25(12), 2889–2897. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601176>
- Meinecke, M., Boucrot, E., Camdere, G., Hon, W.-C., Mittal, R., & McMahon, H. T. (2013). Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6651–6661. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.444869>
- Perera, R. M., Zoncu, R., Lucast, L., De Camilli, P., & Toomre, D. (2006). Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51), 19332–19337. <http://doi.org/10.1073/pnas.0609795104>

Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5657), 495–499. <http://doi.org/10.1126/science.1092586>

Poudel, K. R., Dong, Y., Yu, H., Su, A., Ho, T., Liu, Y., et al. (2016). A time course of orchestrated endophilin action in sensing, bending, and stabilizing curved membranes. *Molecular Biology of the Cell*, 27(13), 2119–2132. <http://doi.org/10.1091/mbc.E16-04-0264>

Renard, H.-F., Simunovic, M., Lemi re, J., Boucrot, E., Garcia-Castillo, M. D., Arumugam, S., et al. (2015). Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis. *Nature*, 517(7535), 493–496. <http://doi.org/10.1038/nature14064>

Sauvonnet, N., Dujancourt, A., & Dautry-Varsat, A. (2005). Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of γ c cytokine receptor. *The Journal of Cell Biology*, 168(1), 155–163. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2556>

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*, 136(3), 583–595.

Subtil, A., H mar, A., & Dautry-Varsat, A. (1994). Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *Journal of Cell Science*.

Suetsugu, S. (2016). Higher-order assemblies of BAR domain proteins for shaping membranes. *Microscopy*, 65(3), 201–210. <http://doi.org/10.1093/jmicro/dfw002>

Tang, Y., Hu, L. A., Miller, W. E., Ringstad, N., Hall, R. A., Pitcher, J. A., et al. (1999). Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel binding partners for the beta1-adrenergic receptor. *Pnas*, 96(22), 12559–12564.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Endophilins A1 and A2 are required for IL-2R endocytosis. Hep2 β cells were transfected using either a siRNA control (siC), or a pool of 4 siRNAs targeting individually endophilin A1, A2 and A3 and analyzed 72h later. **A-** Endocytosis was observed by incubating cells with Tf coupled to AlexaFluor 488 (Tf-A488) and with an anti-IL-2R β coupled to Cy3 (561-Cy3) for 15 min at 37°C. Cells were fixed and stained with HCS Cell Mask to detect cell boundaries, a medial section is shown. **B-** Quantification of endocytosis from cells transfected with siRNAs was performed by measuring the number and fluorescence intensity of vesicles (vesicle intensity) per cell using icy (mean $\pm$ S.E.; $n > 100$ cells in at least three independent experiments, unpaired t-test). **C-** Proteins were extracted and loaded on a SDS-PAGE 10% gel and observed by western blot with an anti-EndoA1/A2 and Flotillin 2 (Flot2) antibodies.

Figure 2: Editing of Endophilin A2 using CRISPR/Cas 9. **A-** Strategy for integration of GFP at the *SH3GL1* locus (EndoA2). Out-out PCR (**B**) and WB (**C**) showing targeted integration of GFP. Control, parental cell line (Hep2 β); EndoA2-GFP^{EN} tagged genome-edited Hep2 β cell line. **D-** Immunofluorescence using anti-endophilin on Hep2 β EndoA2-GFP^{EN} edited cells.

Figure 3: A - Endocytic tracks are highly confined. Each endocytotic track begins by the appearance of a CLC or IL-2R fluorescent spot. Fluorescent spot then remains approximately at the same (x,y) position before eventually disappearing from the TIRF field of view. Spot disappearance marks either the internalization of the clathrin-coated vesicle/IL-2R or its disassembly before effective internalization. In the 3D (x,y,t) kymograph representation of live TIRF films endocytic tracks appear as lines parallel to the time axis. This indicates high confinement of tracks in the (x,y) plane over time. **B - Principles of eTrack.** We first detect fluorescent spots with wavelet-based method Olivo-Marin JC, Pattern recognition 2002 (Olivo-Marin JC, Pattern recognition 2002) implemented in the open-source software Icy ((de Chaumont et al., 2012) de Chaumont et al. Nat. Methods 2012) (plugin *Spot detector*). We then sum the detected spots over time and obtain a global elevation map (x,y,intensity) of the whole process. In this elevation map, each Gaussian peaks results from multiple spot appearances at peak position and thus indicate putative endocytic sites. We then detect each peak with local maximum algorithm and reconstruct endocytic tracks by associating each detected spot in each frame to closest peak. The unambiguous localization of endocytic spots allows us to robustly monitor the intensity of each track, even when detections are missing.

Figure 4: Classification of CLC tracks using statistics and fitting methods. CLC-RFP^{EN}/Dnm2-GFP^{EN} siC (**A**) /siEndoA2 (**B**), CLC-RFP^{EN}/EndoA2-GFP^{EN}siC(**C**)/siDnm2(**D**) cells were imaged by TIRF microscope at 0.5Hz for 300s and analyzed using eTrack implemented in ICY software as detailed in Figure 3. Lifetime distribution of CLC tracks non-co-localize, co-

localized tracks (with Dnm2 or EndoA2) and fitting of co-localized tracks by a mixture model (exponential + 4 Gaussians).

Figure 5: Classification of IL-2R tracks using fitting methods. Hep2 β -Dnm2-GFP^{EN} siC (A)/siEndoA2(B), Hep2 β -EndoA2-GFP^{EN} siC(C)/siDnm2(D) were imaged by TIRF microscope and analyzed using eTrack as previously described. Lifetime distribution of IL-2R tracks non-co-localized, co-localized (with Dnm2 or EndoA2) and fitting of co-localized tracks with a mixture model (exponential + 1 Gaussian)

Figure 6: Rate of co-localization for CLC-DNM2, CLC-EndoA, IL-2R-Dnm2 and IL-2R-EndoA2. CLC and IL-2R tracks presented previously (Fig. 4,5) were analyzed with Icy for their percentages of co-localization with Dnm2 or EndoA2 in each condition: siC, siEndoA2 or siDnm2 (mean of > 12 movies +/- S.E., unpaired t test, *, P<0.05).

Figure 7: Duration of co-localization of Dnm2 and EndoA2 with CLC and IL-2R active tracks. Distribution of the duration of Dnm2 (A-D) or EndoA2 (E-H) co-localization to either active CLC or IL-2R tracks (population 1) in all cell conditions: siC (A, C, E, G), siEndoA2 (B, D), siDnm2 (F, H).

Figure 8: Interaction time of Dnm2 and EndoA2 to CLC and IL-2R active tracks. Distribution of the final time of interaction of Dnm2 (A,B,E,F) or EndoA2 (C,D,G,H) to CLC or IL-2R active tracks in all cell conditions: siC (A, C, E, G), siEndoA2 (D, F), siDnm2 (F, H). Dnm2 and EndoA2 time of interaction were analyzed in proportion to the length of the CLC and IL-2R track (expressed as a % of each track duration).

Figure 9: Intensity profile examples of CLC-Dnm2, CLC-EndoA2, IL-2R-Dnm2 and IL-2R-EndoA2. Representative traces of CLC or IL-2R co-localized with Dnm2 or EndoA2 in all cell conditions siC, siEndoA2 or siDnm2.

Figure S1: Endophilins A1 and A2-GFP overexpression show aberrant pattern. A Image representing the over-expression of Endophilin fused to GFP in Hep2 β cells. B Image showing the endogenous labelling of Endophilin A2 in Hep2 β using specific antibody. C Example of image obtained in TIRF microscopy of Endophilins A1 and A2 –GFP overexpression in Hep2 β cells. D Example of image obtained in TIRF microscopy of Hep2 β Endophilin A2 gene edited cell line.

Figure S2: Comparison of eTrack with state-of-the-art Bayesian algorithm (eMHT) We plotted the histograms of track durations and total displacement obtained with eTrack (light

blue) and eMHT (light red) for clathrin and IL-2R TIRF live imaging. We circumscribed the analysis to tracks with durations between 10 and 300 seconds.

Figure S3: Fitting of lifetimes distribution for co-localized and non-co-localized CLC tracks of control cases pooled and BIC on CLC co-localized tracks.

Figure S4: Duration of co-localization of Dnm2 and EndoA2 with CLC and IL-2R non-active tracks. Distribution of the duration of Dnm2 (**A-D**) or EndoA2 (**E-H**) co-localization to either CLC tracks (population 2, 3, 4) or IL-2R tracks (population 2) in control condition (siC).

Figure S5: Distribution of mono- and multi-co-localization of Dnm2 and EndoA2 with CLC and IL-2R depending of the population. We plotted the percentage of mono- and multi-co-localisation between CLC in (**A**) and IL-2R in (**B**) with Dnm2 or EndoA2 in each population.

Figure S6: Western blot showing the depletion of Dnm2 or EndoA2. Proteins from siRNA treated cells (except those of Fig. 1) were extracted and loaded on a SDS-PAGE 10% gel and observed by western blot with an anti-EndoA2, anti-Dnm2 and GADPH as internal loading control antibodies.

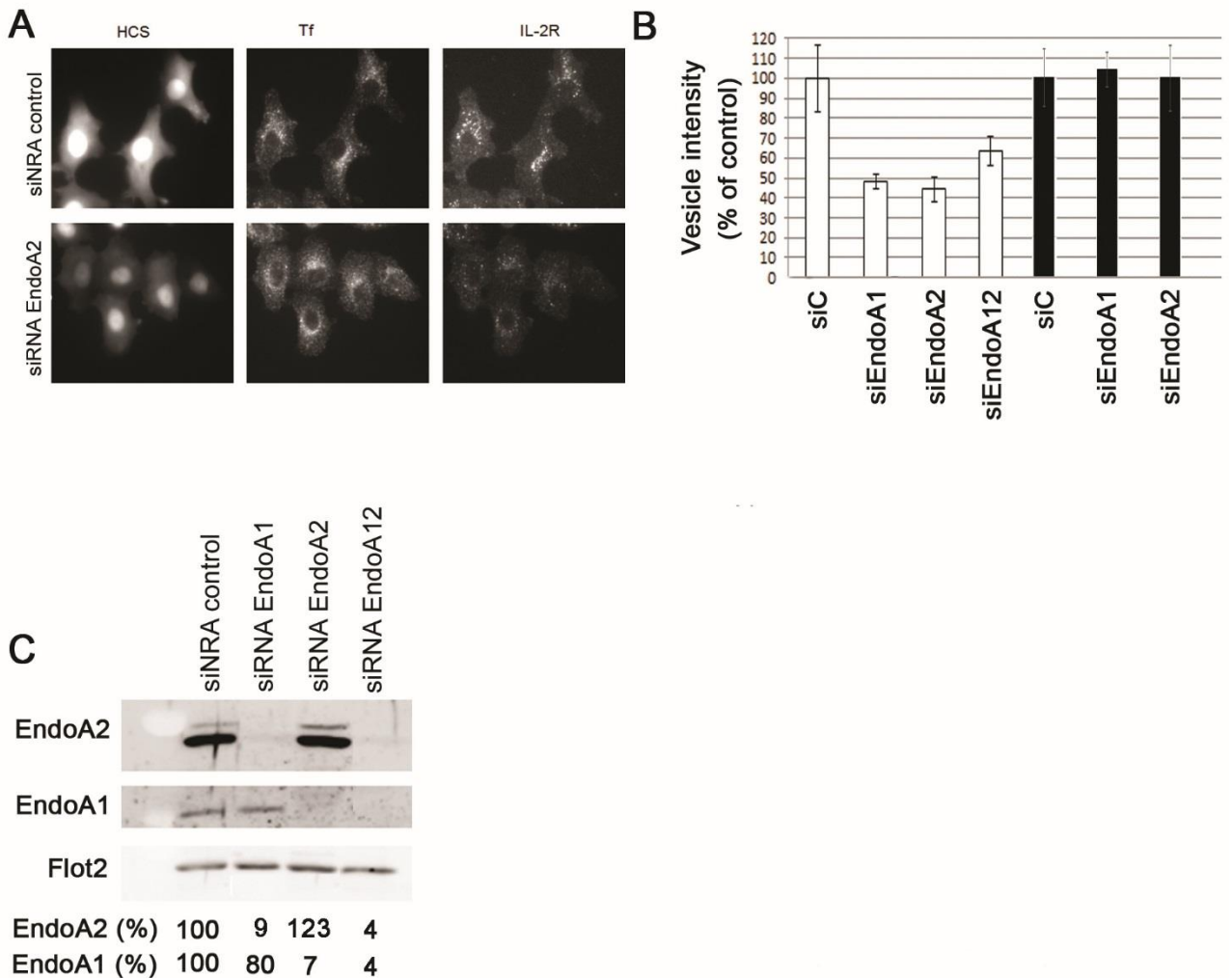


Figure 1: Endophilins A1 and A2 are required for IL-2R endocytosis. Hep2 β cells were transfected using either a siRNA control (siC), or a pool of 4 siRNAs targeting individually endophilin A1, A2 and A3 and analyzed 72h later. **A-** Endocytosis was observed by incubating cells with Tf coupled to AlexaFluor 488 (Tf-A488) and with an anti-IL-2R β coupled to Cy3 (561-Cy3) for 15 min at 37° C. Cells were fixed and stained with HCS Cell Mask to detect cell boundaries, a medial section is shown. **B-** Quantification of endocytosis from cells transfected with siRNAs was performed by measuring the number and fluorescence intensity of vesicles (vesicle intensity) per cell using icy (mean $\pm$ S.E.; $n > 100$ cells in at least three independent experiments, unpaired t-test). **C-** Proteins were extracted and loaded on a SDS-PAGE 10% gel and observed by western blot with an anti-EndoA1/A2 and Flotillin 2 (Flot2) antibodies

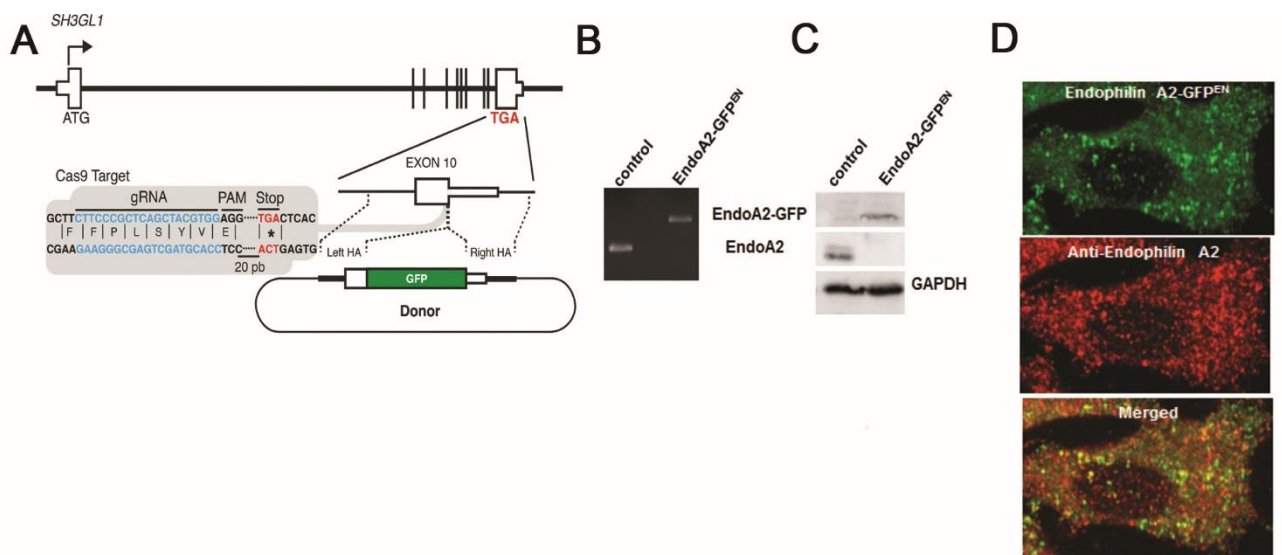
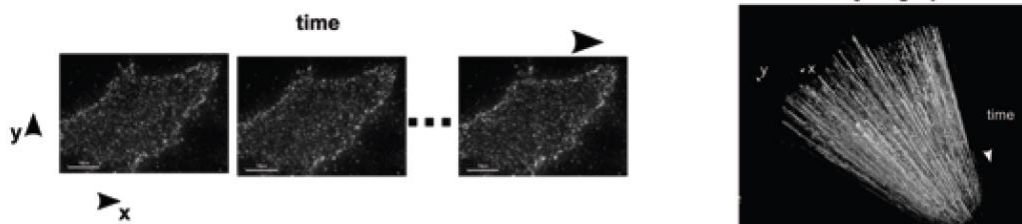


Figure 2: Editing of Endophilin A2 using CRISPR/Cas 9. **A-** Strategy for integration of GFP at the *SH3GL1* locus (EndoA2). **B-** Out-out PCR (**B**) and WB (**C**) showing targeted integration of GFP. Control, parental cell line (Hep2 β); EndoA2-GFP^{EN} tagged genome-edited Hep2 β cell line. **D-** Immunofluorescence using anti-endophilin on Hep2 β EndoA2-GFP^{EN} edited cells.

A - Endocytic tracks are highly confined



B - Principles of non-Bayesian, global tracking

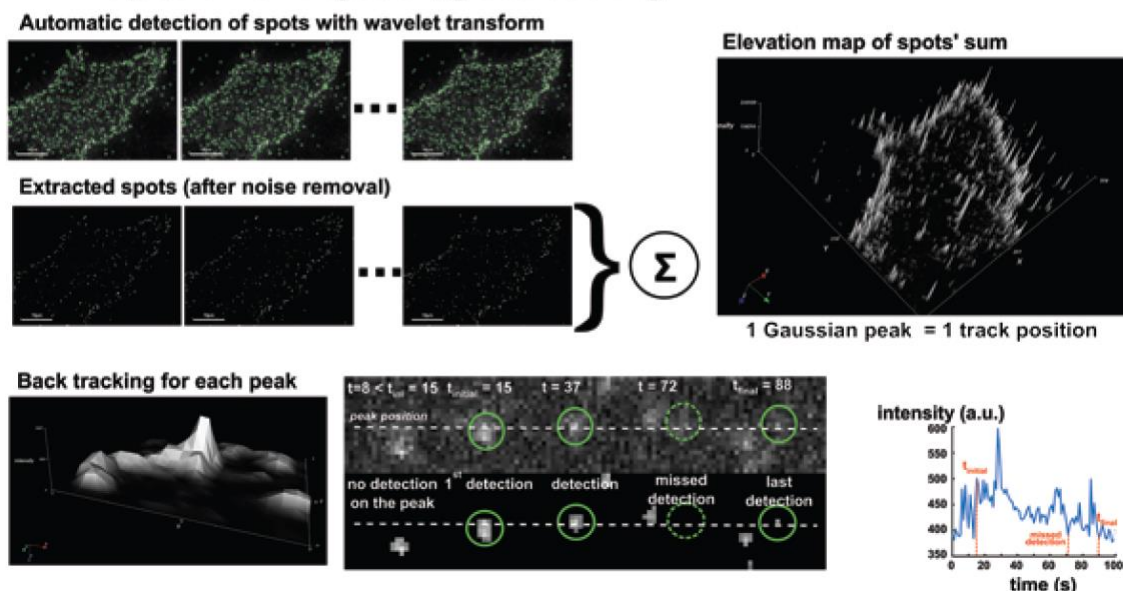


Figure 3: A - Endocytic tracks are highly confined. Each endocytotic track begins by the appearance of a CLC or IL-2R fluorescent spot. Fluorescent spot then remains approximately at the same (x,y) position before eventually disappearing from the TIRF field of view. Spot disappearance marks either the internalization of the clathrin-coated vesicle/IL-2R or its disassembly before effective internalization. In the 3D (x,y,t) kymograph representation of live TIRF films endocytic tracks appear as lines parallel to the time axis. This indicates high confinement of tracks in the (x,y) plane over time. **B - Principles of eTrack.** We first detect fluorescent spots with wavelet-based method Olivo-Marín JC, Pattern recognition 2002 (Olivo-Marín JC, Pattern recognition 2002) implemented in the open-source software Icy ((de Chaumont et al., 2012) de Chaumont et al. Nat. Methods 2012) (plugin *Spot detector*). We then sum the detected spots over time and obtain a global elevation map (x,y,intensity) of the whole process. In this elevation map, each Gaussian peaks results from multiple spot appearances at peak position and thus indicate putative endocytic sites. We then detect each peak with local maximum algorithm and reconstruct endocytic tracks by associating each detected spot in each frame to closest peak. The unambiguous localization of endocytic spots allows us to robustly monitor the intensity of each track, even when detections are missing.

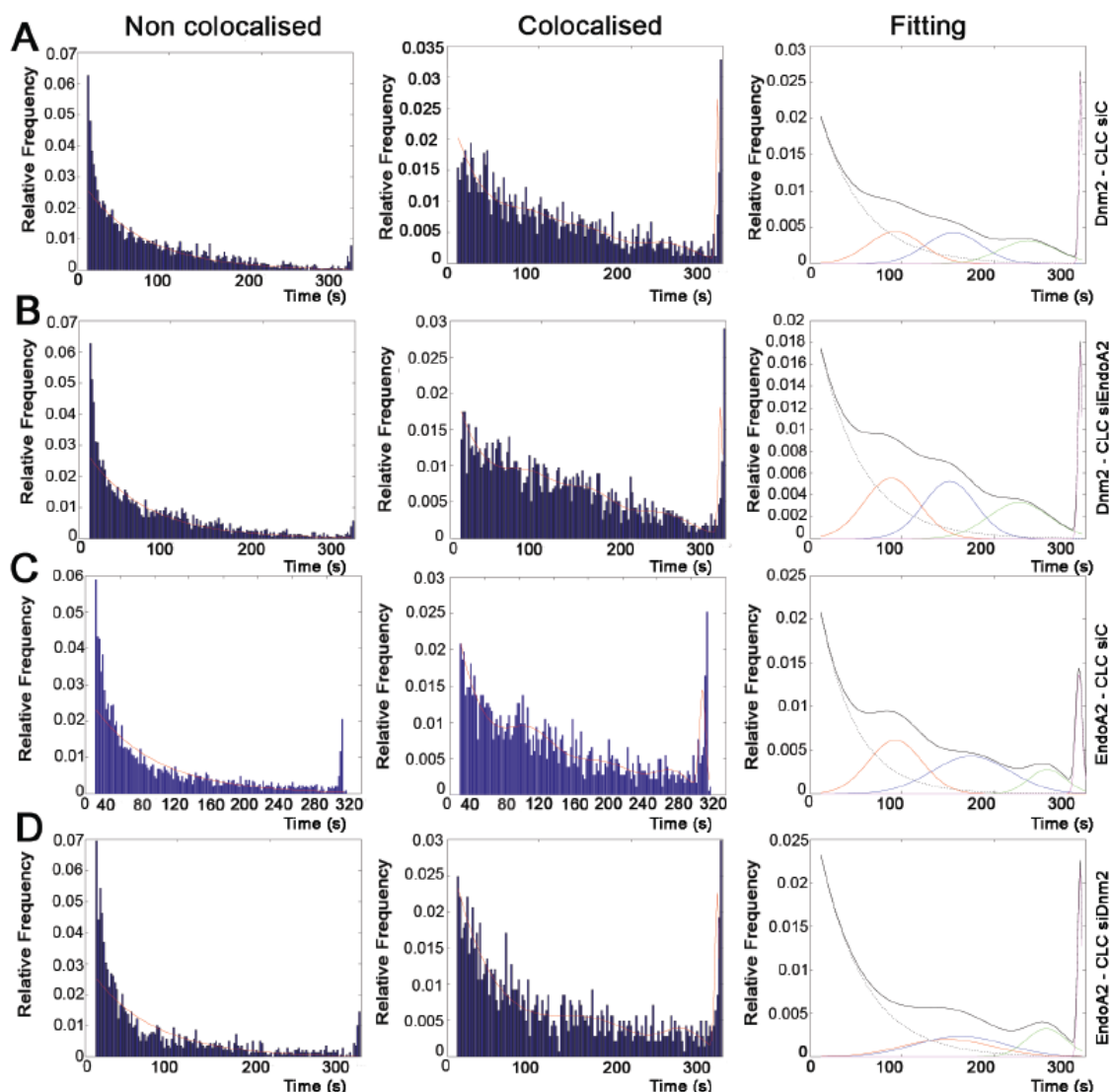


Figure 4: Classification of CLC tracks using statistics and fitting methods. CLC-RFP^{EN} /Dnm2-GFP^{EN} siC (A) /siEndoA2 (B), CLC-RFP^{EN}/EndoA2-GFP^{EN}siC(C)/siDnm2(D) cells were imaged by TIRF microscope at 0.5Hz for 300s and analyzed using eTrack implemented in ICY software as detailed in Figure 3. Lifetime distribution of CLC tracks non-co-localize, co-localized tracks (with Dnm2 or EndoA2) and fitting of co-localized tracks by a mixture model (exponential + 4 Gaussians).

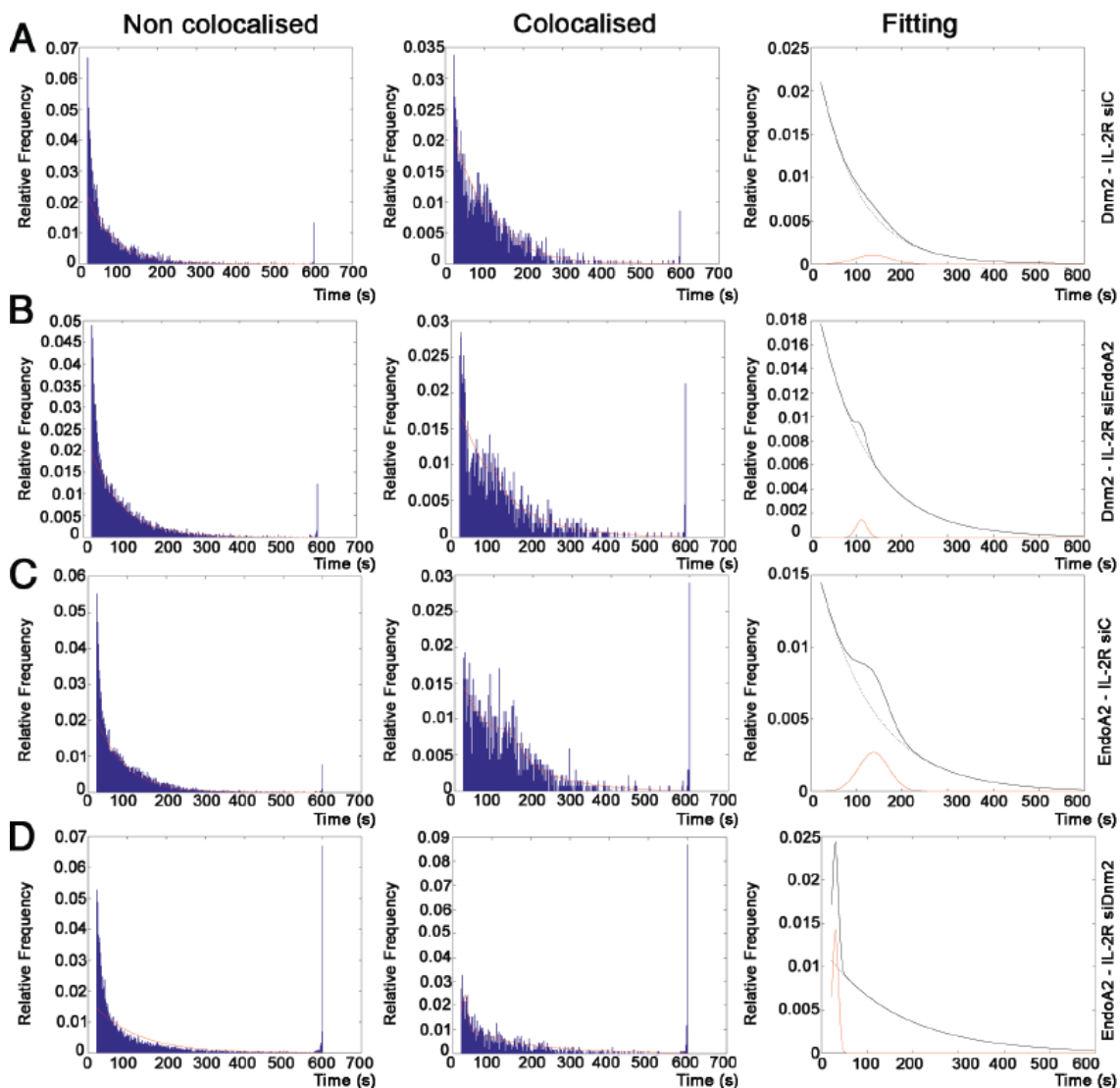


Figure 5: Classification of IL-2R tracks using fitting methods. Hep2 β -Dnm2-GFP^{EN} siC (A)/siEndoA2(B), Hep2 β -EndoA2-GFP^{EN} siC(C)/siDnm2(D) were imaged by TIRF microscope and analyzed using eTrack as previously described. Lifetime distribution of IL-2R tracks non-co-localized, co-localized (with Dnm2 or EndoA2) and fitting of co-localized tracks with a mixture model (exponential + 1 Gaussian)

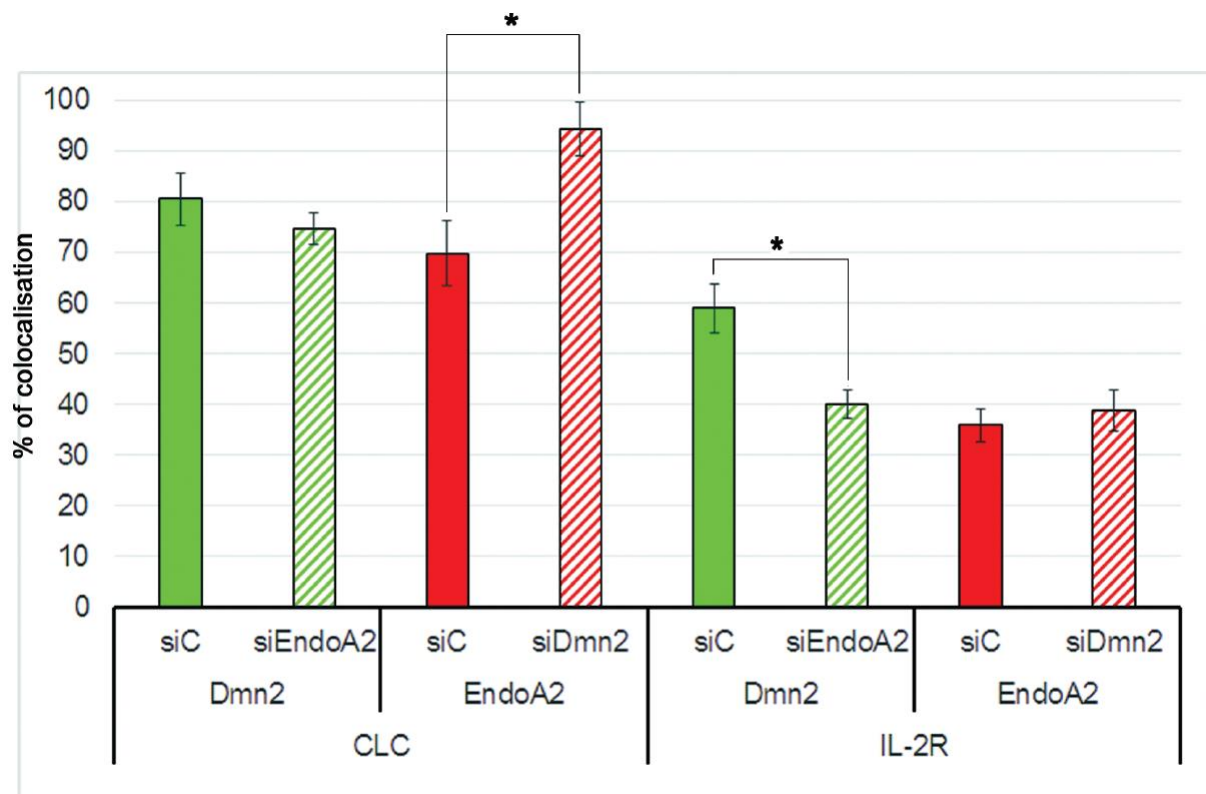


Figure 6: Rate of co-localization for CLC-Dnm2, CLC-EndoA2, IL-2R-Dnm2 and IL-2R-EndoA2. CLC and IL-2R tracks presented previously (Fig. 4,5) were analyzed with Icy for their percentages of co-localization with Dnm2 or EndoA2 in each condition: siC, siEndoA2 or siDnm2 (mean of > 12 movies $\pm$ S.E., unpaired t test, *, $P < 0.05$).

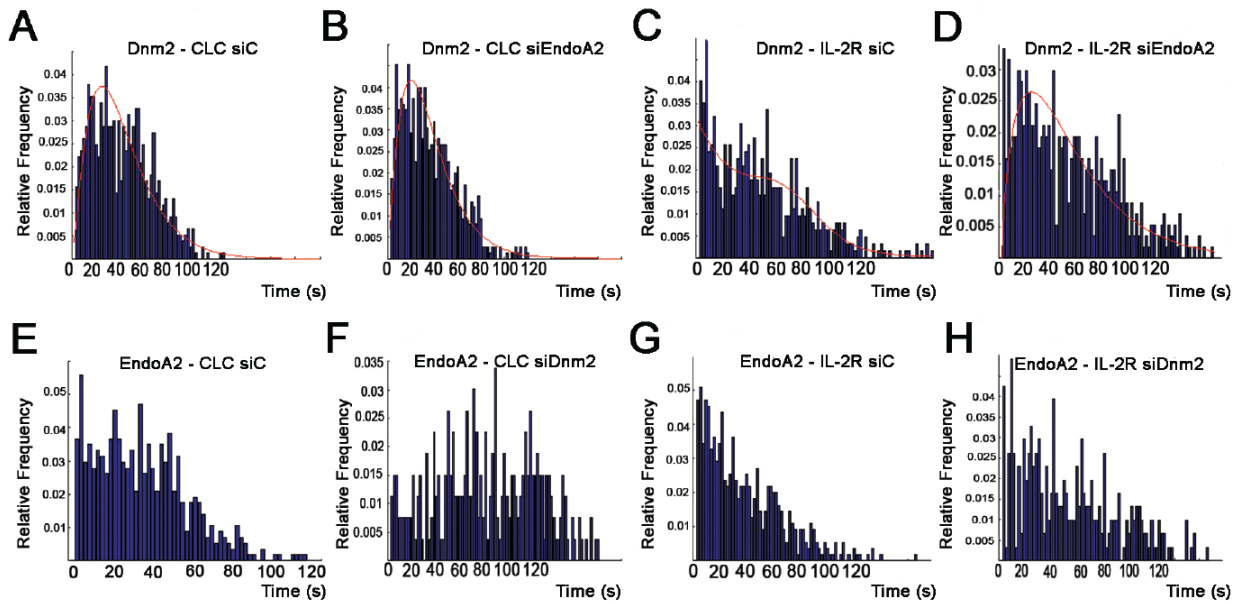


Figure 7: Duration of co-localization of Dnm2 and EndoA2 with CLC and IL-2R active tracks. Distribution of the duration of Dnm2 (A-D) or EndoA2 (E-H) co-localization to either active CLC or IL-2R tracks (population 1) in all cell conditions: siC (A, C, E, G), siEndoA2 (B, D), siDnm2 (F, H).

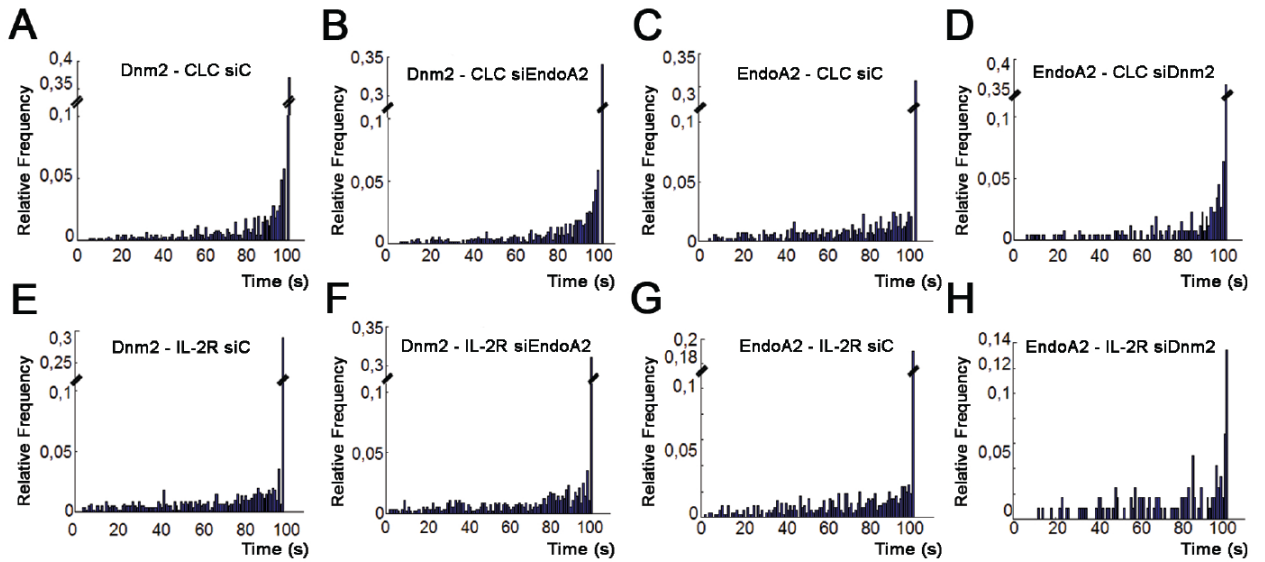


Figure 8: Interaction time of Dnm2 and EndoA2 to CLC and IL-2R active tracks. Distribution of the final time of interaction of Dnm2 (A,B,E,F) or EndoA2 (C,D,G,H) to CLC or IL-2R active tracks in all cell conditions: siC (A, C, E, G), siEndoA2 (D, F), siDnm2 (F, H). Dnm2 and EndoA2 time of interaction were analyzed in proportion to the length of the CLC and IL-2R track (expressed as a % of each track duration).

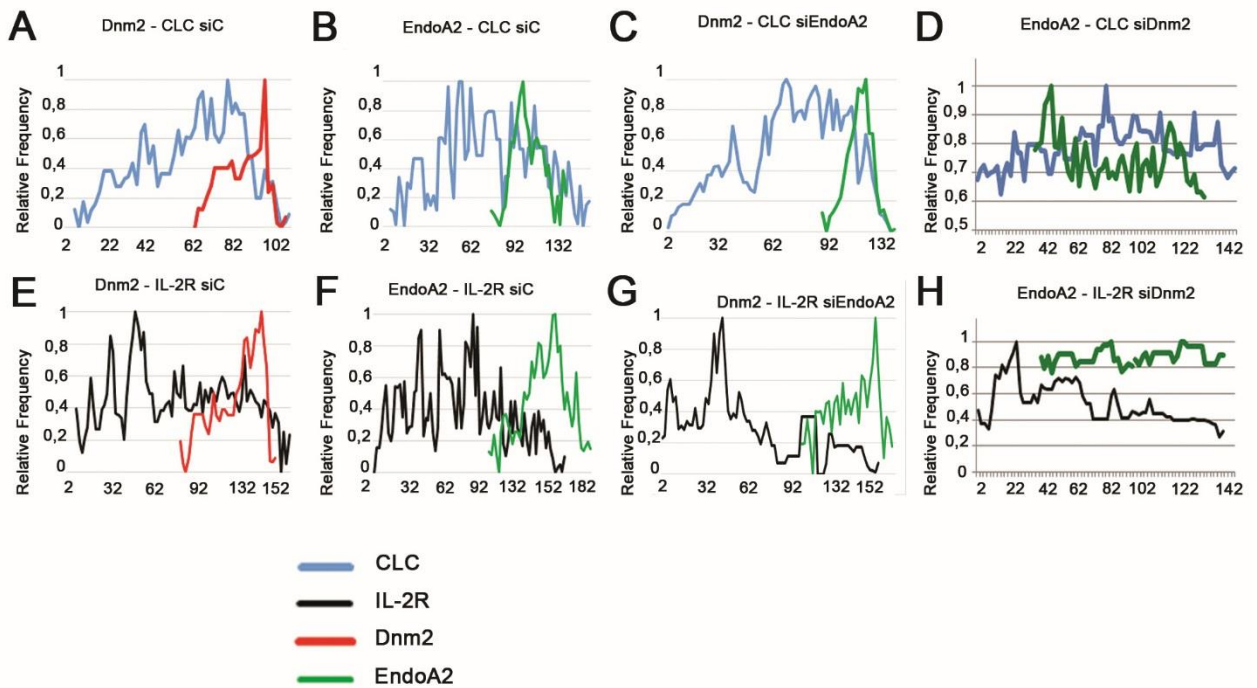


Figure 9: Intensity profile examples of CLC-Dnm2, CLC-EndoA2, IL-2R-Dnm2 and IL-2R-EndoA2. Representative traces of CLC or IL-2R co-localized with Dnm2 or EndoA2 in all cell conditions siC, siEndoA2 or siDnm2.

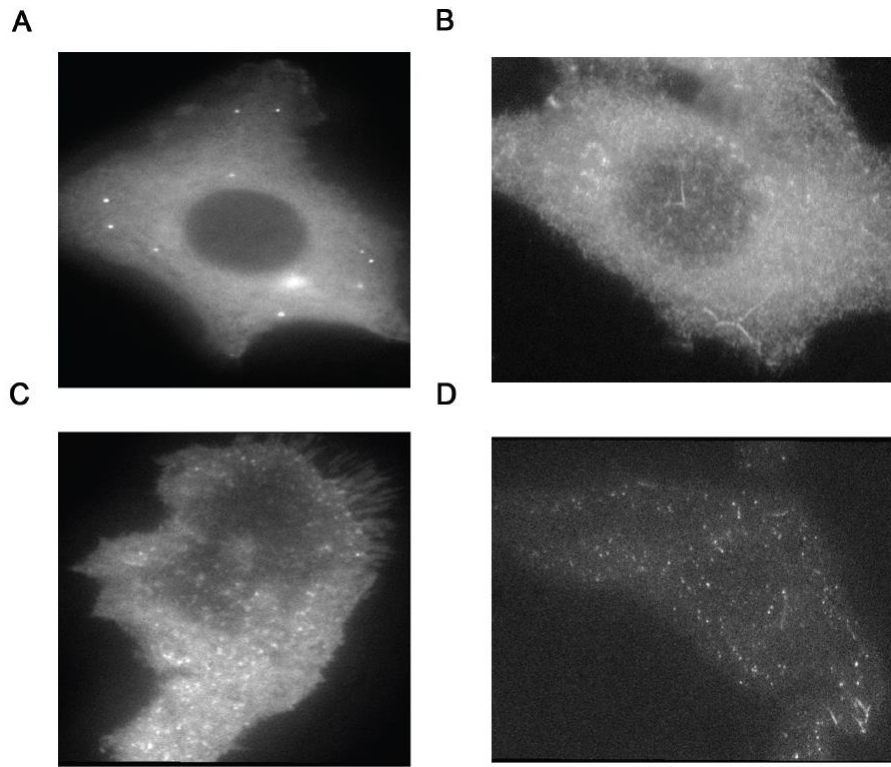


Figure S1: Endophilins A1 and A2-GFP overexpression show aberrant pattern. **A** Image representing the over-expression of Endophilin fused to GFP in Hep2 β cells. **B** Image showing the endogenous labelling of Endophilin A2 in Hep2 β using specific antibody. **C** Example of image obtained in TIRF microscopy of Endophilins A1 and A2 – GFP overexpression in Hep2 β cells. **D** Example of image obtained in TIRF microscopy of Hep2 β Endophilin A2 gene edited cell line.

Comparison with Bayesian algorithm

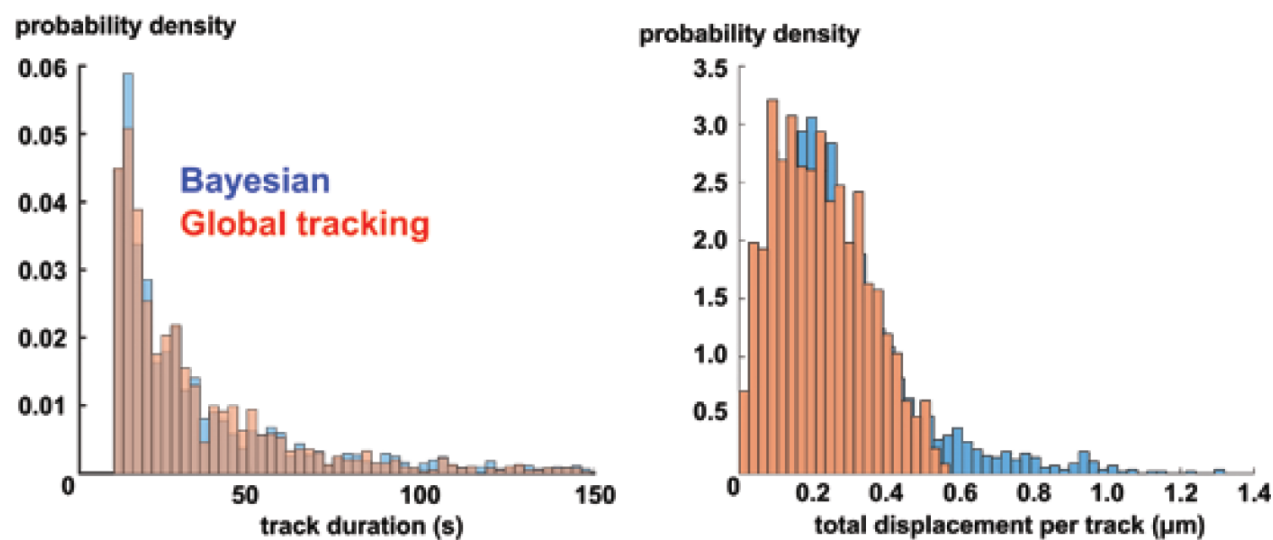


Figure S2: Comparison of eTrack with state-of-the-art Bayesian algorithm (eMHT) We plotted the histograms of track durations and total displacement obtained with eTrack (light blue) and eMHT (light red) for clathrin and IL-2R TIRF live imaging. We circumscribed the analysis to tracks with durations between 10 and 300 seconds.

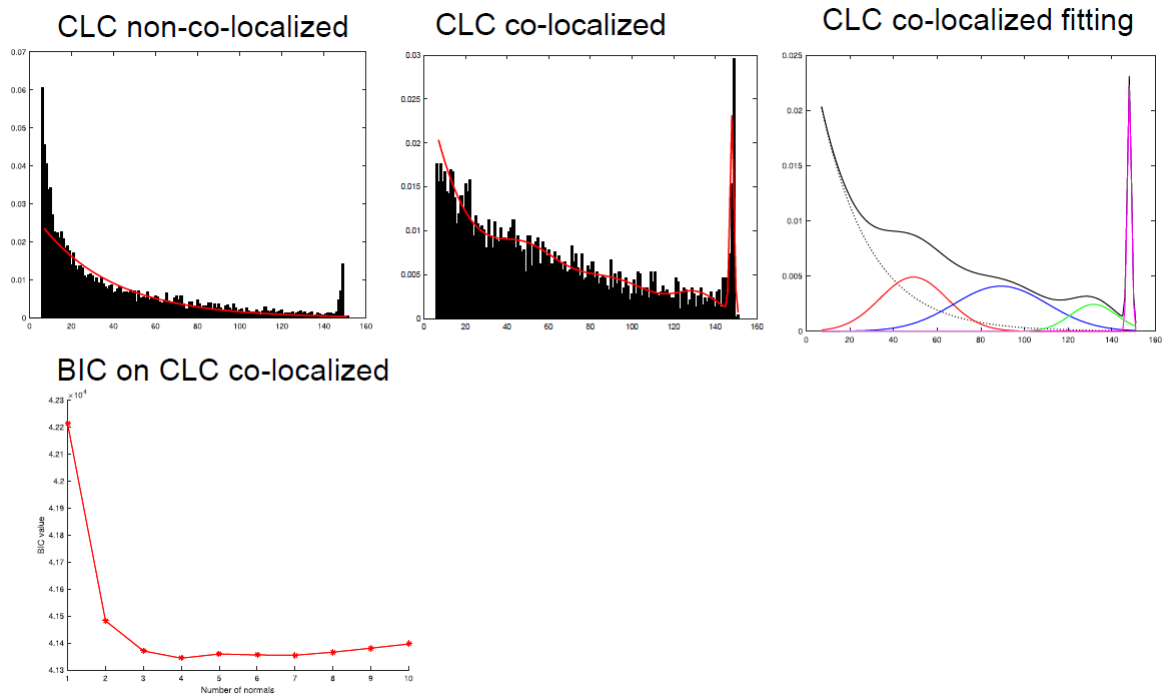


Figure S3: Fitting of lifetimes distribution for co-localized and non-co-localized CLC tracks of control cases pooled and BIC on CLC co-localized tracks

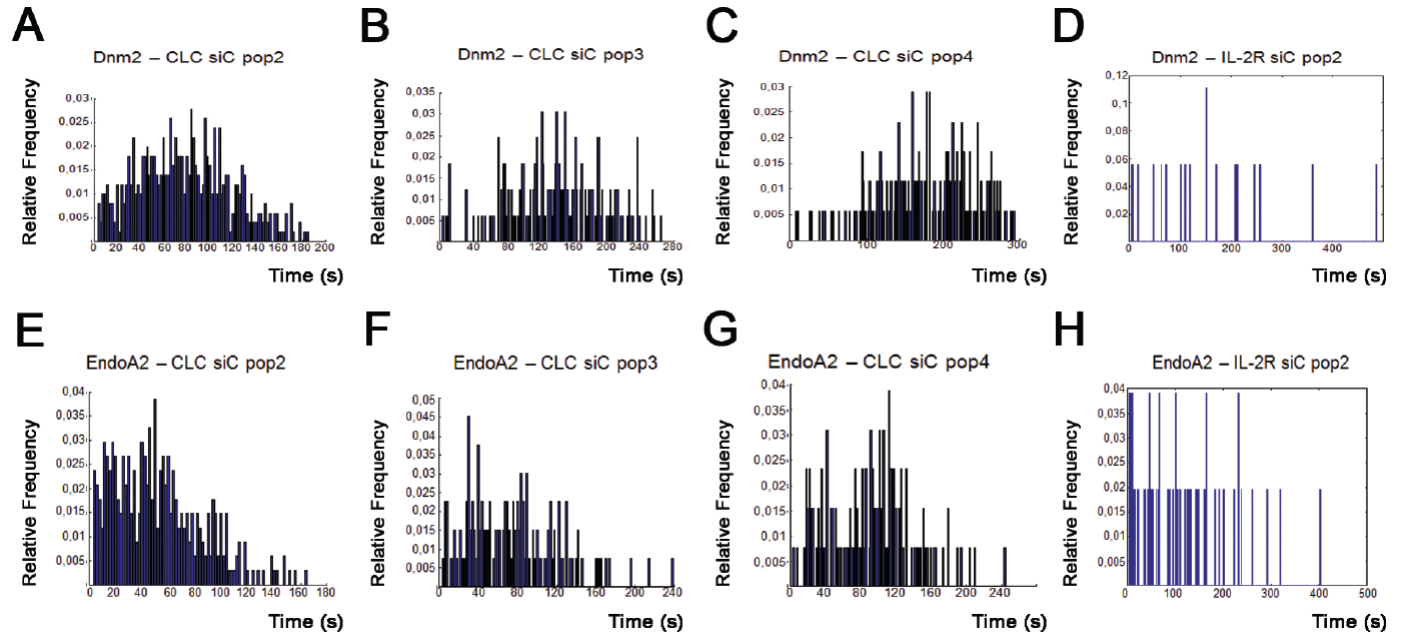


Figure S4: Duration of co-localization of Dnm2 and EndoA2 with CLC and IL-2R non-active tracks. Distribution of the duration of Dnm2 (A-D) or EndoA2 (E-H) co-localization to either CLC tracks (population 2, 3, 4) or IL-2R tracks (population 2) in control condition (siC).

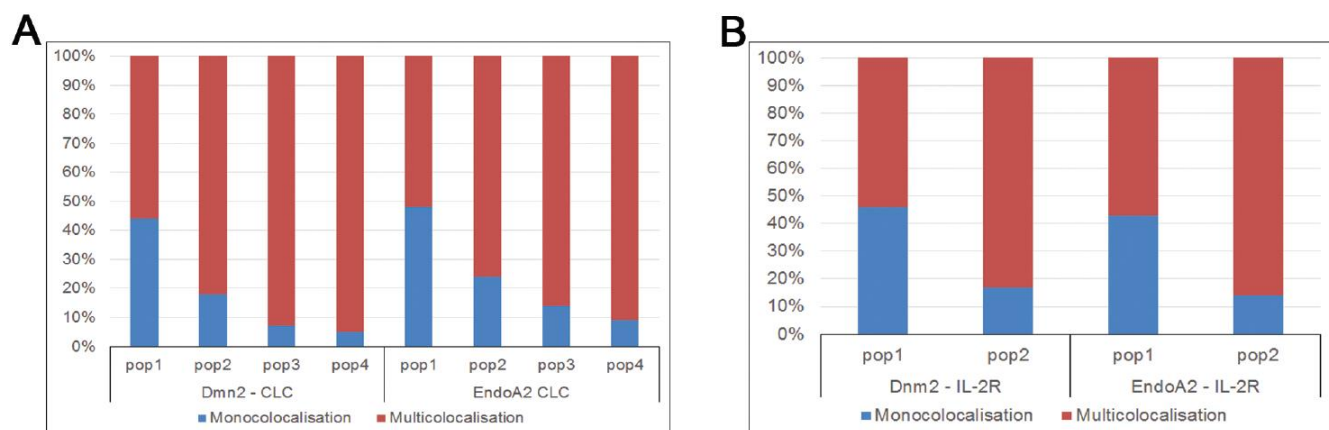


Figure S5: Distribution of mono- and multi-co-localization of Dnm2 and EndoA2 with CLC and IL-2R depending of the population. We plotted the percentage of mono- and multi-co-localisation between CLC in (A) and IL-2R in (B) with Dnm2 or EndoA2 in each population.

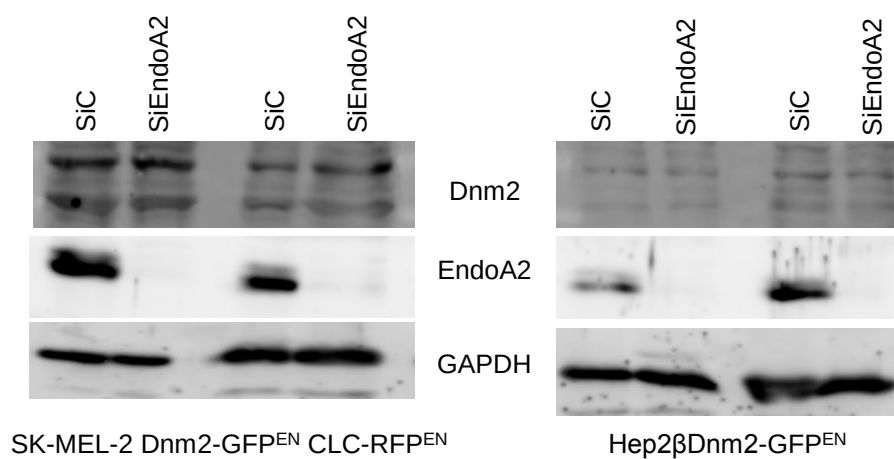
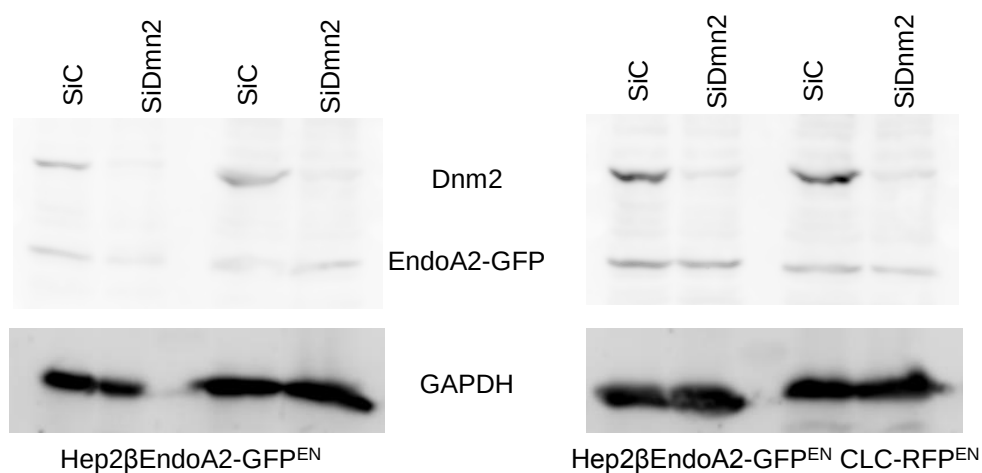
A**B**

Figure S6: Western blot showing the depletion of Dnm2 or EndoA2. Proteins from siRNA treated cells (except those of Fig. 1) were extracted and loaded on a SDS-PAGE 10% gel and observed by western blot with an anti-EndoA2, anti-Dnm2 and GAPDH as internal loading control antibodies.

Titre : Le rôle des protéines courbant les membranes dans l'endocytose indépendante de la clathrine suivie par le récepteur de l'interleukine 2

Mots clés : cytokine, endocytose, endophiline, dynamine, membrane

Résumé :

L'endocytose permet l'internalisation d'éléments présents dans le milieu extracellulaire tels que les nutriments. Ce processus prend place dans la membrane plasmique. Les courbures de la membrane jouent un rôle essentiel dans l'endocytose pour générer une invagination initiale, un puits, puis une vésicule qui se sépare ensuite de la membrane plasmique pour fusionner avec les compartiments intracellulaires. Il existe plusieurs voies d'endocytose qui peuvent être classées selon des critères tels que la taille des vésicules produites, la médiation par un récepteur ou la présence d'un manteau recouvrant les vésicules. La voie d'endocytose la mieux caractérisée est celle dépendante de la clathrine. Mon laboratoire d'accueil travaille sur l'entrée du récepteur de l'interleukine 2 (IL-2R). Ce récepteur peut entrer de façon constitutive ou induite en présence de son ligand l'IL-2. Les deux voies sont indépendantes de la clathrine. Lors de mon arrivée dans le laboratoire, ces voies étaient encore peu caractérisées, notamment les facteurs induisant les courbures membranaires restaient à identifier. Ces facteurs doivent être particulièrement impliqués car les vésicules contenant l'IL-2R sont dépourvues de manteaux.

Un crible par interférence à ARN, réalisé avant mon arrivée avait permis de proposer des protéines candidates pouvant courber les membranes. La première partie de ma thèse a consisté à confirmer l'importance de certaines protéines issues de ce crible puis à étudier leurs rôles dans la voie constitutive de l'IL-2R. Parmi ces protéines confirmées, deux familles de facteurs étaient particulièrement intéressants pour leur capacité à courber les membranes, les phospholipases D et les endophilines. Ces dernières ont permis d'identifier une nouvelle voie d'entrée nommée « Fast Endophilin Mediated Endocytosis » FEME dans laquelle l'endophiline joue un rôle essentiel et qui est empruntée par de nombreux récepteurs transmettant le signal. La voie FEME partage plusieurs facteurs communs avec la voie d'endocytose induite de l'IL-2R. Pour finir, mes travaux de thèse ont porté sur l'orchestration de l'endophiline et de la dynamine dans la voie d'endocytose constitutive de l'IL-2R. Ces deux facteurs sont impliqués en fin d'endocytose, pour scinder les vésicules de la membrane plasmique. Cependant, ces deux protéines n'ont pas la même orchestration. Nos travaux montrent une action distincte de l'endophiline et de la dynamine dans les voies d'endocytose dépendante et indépendante de la clathrine.

Title : The role of membrane-bending proteins in clathrin-independent endocytosis used by the interleukin 2 receptor

Keywords : cytokine, endocytosis, endophilin, dynamin, membrane

Abstract :

Endocytosis allows the uptake of elements from the extracellular fluid such as nutrients. This process takes place at the plasma membrane. The membrane curvatures play an important role in endocytosis for the production of initial invagination to form a pit that will be then separate from the plasma membrane and will go to the intracellular compartments. Several routes of endocytosis exist and can be classified depending on vesicles size formed, receptor mediated endocytosis or coat on vesicles. The well-known characterized endocytosis pathway is the clathrin mediated one. My lab is working on interleukin 2 receptor (IL-2R) entry. This receptor can enter either constitutively or upon induction by the ligand IL-2. Both uptake pathways are independent of clathrin. When I arrived in the lab, those pathways were still under characterization, in particular the factors inducing the membrane curvature. Their role should be important since IL-2R containing vesicles are coated free.

A small interfering RNA screen performed before my PhD, allowed to identify new candidates. The first part of my thesis was to verify the involvement of some of them in the IL-2R constitutive pathway and then to study their role in this pathway. Among them, 2 families of proteins were particularly interesting as they can curve membranes, phospholipases D and endophilins. The endophilin allowed the discovery of a new route called "Fast Endophilin Mediated Endocytosis" (FEME) in which it plays an essential role and which is used by numerous receptors that transmit signal. The FEME pathway shares several factors that are common with the IL-2 induced endocytosis pathway. Then, I conducted a work on the orchestration of endophilin and dynamin during the constitutive IL-2R endocytosis. Both factors are recruited at the end of the mechanism, to separate the vesicles from the plasma membrane. However, both proteins do not have the same orchestration. Our work show a distinct action of endophilin and dynamin in clathrin dependent and independent endocytosis.