



**HAL**  
open science

# Dynamique d'échange de la dynamine mesurée dans les cellules vivantes pendant la formation de vésicules d'endocytose

Léa Claverie

► **To cite this version:**

Léa Claverie. Dynamique d'échange de la dynamine mesurée dans les cellules vivantes pendant la formation de vésicules d'endocytose. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0053 . tel-03200912

**HAL Id: tel-03200912**

**<https://theses.hal.science/tel-03200912>**

Submitted on 17 Apr 2021

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ NEUROSCIENCES

Par Léa CLAVERIE

**Dynamique d'échange de la dynamine mesurée dans les  
cellules vivantes pendant la formation de vésicules  
d'endocytose**

Sous la direction de : David PERRAIS

Soutenue le mardi 16 Avril 2019

Membres du jury :

Mme SANS, Nathalie

Mme RENNER, Marianne

M. MONTAGNAC, Guillaume

Mme MOREAU, Violaine

M. VITALE, Nicolas

Directeur de recherche INSERM

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur



« Comment les homards grandissent-ils ? »

*Le homard est un petit mollusque tout moelleux qui vit dans une carapace très rigide, et cette carapace ne grandit jamais. Alors comment le homard grandit-il ?*

*Et bien, plus le homard grandit, plus cette carapace devient très étroite et le homard se sent sous pression et inconfortable. Alors, il va sous un rocher pour se protéger des prédateurs, brise sa carapace et en produit une nouvelle. Eventuellement celle-ci aussi devient trop étroite et inconfortable ; retour sous le rocher etc. Le homard répète ce processus encore et encore.*

*Le stimulus pour que le homard puisse grandir est qu'il se sent inconfortable. Si les homards avaient des docteurs, ils ne grandiraient jamais. Car dès qu'il se sentirait inconfortable, il irait chez le docteur prendre un Valium et se sentirait bien soudainement. Il ne se débarrassera jamais de sa carapace. Si nous utilisons l'adversité intelligemment, on peut grandir grâce à elle.*

- Abraham Joshua Twerski

*À mon arrière-grand-mère Armagnac Lagleyze,  
et à ma grand-mère Jacqueline Lagleyze*



# Table des matières

Remerciements.....	13
Résumé.....	17
Abstract.....	19
Publications et communications.....	21
Abréviations.....	23
Préambule.....	29
Introduction.....	31
<b>1. Trafic membranaire – Un mécanisme bien organisé.....</b>	<b>31</b>
1.1. Vue d'ensemble et définitions.....	31
1.2. Marqueurs du trafic membranaire et régulateurs.....	33
1.2.1. Rôle des phosphoinositides dans le trafic membranaire.....	34
1.2.2. Rôle des Rab dans le trafic membranaire.....	36
1.3. Endocytose et trafic membranaire.....	38
1.3.1. Les différents modes d'endocytose.....	39
1.3.1.1. Phagocytose.....	40
1.3.1.2. Macropinocytose.....	40
1.3.1.3. L'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles.....	41
1.3.1.4. Endocytose dépendante de la cavéoline.....	42
1.3.1.5. L'endocytose dépendante de la clathrine.....	43
<b>2. L'Endocytose Dépendante de la Clathrine.....</b>	<b>45</b>
2.1. Découverte de l'endocytose dépendante de la clathrine.....	45
2.2. Les différentes étapes de la formation des vésicules d'endocytose.....	46
2.2.1. Initiation : la nucléation.....	48
2.2.1.1. Maturation : sélection des cargos et formation du manteau de clathrine.....	51
2.2.1.2. Sélection des cargos.....	51
2.2.1.3. Formation du manteau de clathrine.....	52
2.2.2. Invagination : les effecteurs de la courbure membranaire.....	53
2.2.2.1. La clathrine.....	53
2.2.2.2. Les protéines à domaines ENTH et ANTH.....	54
2.2.2.3. Les protéines à domaine BAR.....	55
2.2.2.4. L'actine.....	55
2.2.3. Scission/Fission : naissance des vésicules.....	56
2.2.4. Déshabillage/désassemblage du manteau de la vésicule.....	58
2.3. Rôles fonctionnels de l'endocytose dépendante de la clathrine.....	58
2.3.1. Endocytose et absorption des nutriments.....	58
2.3.2. Endocytose et dégradation.....	59

2.3.3.	Endocytose et recyclage .....	59
2.3.4.	Endocytose et signalisation .....	59
2.3.5.	Endocytose et migration .....	60
2.3.6.	Endocytose et polarité cellulaire .....	61
2.3.7.	Endocytose et neurotransmission .....	61
2.3.8.	Endocytose et mitose .....	62
2.4.	Visualisation de l'endocytose .....	62
2.4.1.	Internalisation de cargo .....	62
2.4.2.	Visualisation de la dynamique de la clathrine .....	63
2.4.3.	Les déterminants morphologiques .....	66
2.4.4.	Observation de la scission vésiculaire .....	69
<b>3.</b>	<b>La dynamine</b> .....	<b>70</b>
3.1.	Découverte de la dynamine .....	70
3.2.	Les isoformes de la dynamine .....	70
3.3.	Les protéines de type dynamine .....	71
3.4.	Structure de la dynamine .....	72
3.4.1.	Les différents domaines de la dynamine et leurs rôles .....	72
3.4.1.1.	Le domaine GTPase (domaine G) .....	73
3.4.1.2.	L'élément de signalisation de faisceau (BSE) ou « cou » .....	73
3.4.1.3.	Le domaine effecteur GTPase (GED) .....	74
3.4.1.4.	Le domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD) .....	74
3.4.1.5.	Le domaine riche en proline (PRD) .....	74
3.5.	Dimérisation de la dynamine .....	75
3.6.	Fonctions de la dynamine .....	76
3.6.1.	Oligomérisation en hélice de la dynamine à la surface des membranes .....	76
3.6.2.	La dynamine est un catalyseur de fission membranaire dépendant de l'hydrolyse du GTP .....	77
3.6.3.	Les hélices de dynamine se resserrent en présence de GTP .....	79
3.6.4.	Aspects biomécaniques du fonctionnement de la dynamine .....	83
3.6.4.1.	Contribution de la constriction et de la tension membranaire pour la fission .....	83
3.6.4.2.	Désassemblage de la dynamine après hydrolyse du GTP .....	84
3.6.4.3.	Courbure par le domaine PH .....	84
3.7.	Les différents modèles de scission .....	85
3.7.1.	Le modèle de désassemblage à deux étapes .....	86
3.7.1.1.	Limites du modèle de désassemblage .....	87
3.7.2.	Le modèle de constriction/à cliquets .....	88
3.7.2.1.	Limites du modèle de constriction .....	89
3.8.	Inhibition de la dynamine .....	90

3.8.1.	Les petites molécules inhibitrices.....	91
3.8.2.	Les peptides biomimétiques.....	92
3.9.	Modifications post-traductionnelles .....	93
3.10.	Dynamine et pathologies.....	93
3.11.	Recrutement et fonction de la dynamine dans les cellules.....	94
<b>Objectifs de la thèse</b>	.....	<b>97</b>
<b>Matériels et Méthodes</b>	.....	<b>99</b>
<b>1. Mise en œuvre expérimentale</b>	.....	<b>99</b>
1.1.	Cultures cellulaires .....	99
1.1.1.	Fibroblaste 3T3 .....	99
1.1.2.	MEF triple knock-out dynamine .....	99
1.1.3.	Maintenance.....	100
1.2.	Constructions moléculaires et transfection .....	100
<b>2. Approches - Principes et intérêts</b>	.....	<b>101</b>
2.1.	Microscopie de fluorescence par réflexion interne totale (TIRF).....	101
2.2.	Le protocole d'échange de pH extracellulaire – Le protocole ppH .....	103
2.2.1.	La genèse du protocole ppH.....	103
2.2.2.	Description du poste et de l'acquisition.....	105
2.2.2.1.	Trajet optique.....	106
2.2.2.2.	Utilisation de « gâchettes ».....	107
2.2.2.3.	Echange rapide de solution extracellulaire .....	108
2.2.2.4.	La dialyse cellulaire et l'enregistrement patch-clamp .....	109
2.2.2.5.	Surveillance électrique .....	110
2.2.2.6.	Solution intracellulaire .....	110
2.2.2.7.	Surveillance des paramètres cellulaires .....	112
2.2.3.	Le second poste d'imagerie.....	113
2.2.4.	Analyses post-acquisitions .....	114
2.2.4.1.	Analyse d'image pour la détection de l'endocytose .....	114
2.2.4.2.	Analyse d'image multidimensionnelle : MIA.....	114
2.2.4.3.	Détection des évènements d'endocytose.....	115
2.2.4.4.	Quantification des évènements d'endocytose et co-localisation .....	116
2.2.4.5.	Quantification de la fréquence des évènements d'endocytose .....	117
2.3.	Le FRAP (Retour de Fluorescence Après Photoblanchiment) .....	118
2.3.1.	Description du FRAP .....	118
2.3.2.	Description du poste et de l'acquisition.....	121
2.3.2.1.	FRAP .....	122
2.3.2.2.	Analyse d'images.....	122
2.4.	Le sptPALM.....	123

2.4.1.	Description du PALM et du sptPALM .....	123
2.4.2.	Protéine fluorescente photoconvertible mEos3.2 .....	126
2.4.3.	Description du poste et de l'acquisition.....	127
2.4.4.	Analyses d'image de sptPALM.....	129
2.4.4.1.	Détection et localisation .....	129
2.4.4.2.	Reconstruction des trajectoires .....	131
2.4.4.3.	Suivi de particules uniques.....	131
2.4.4.4.	Tri des trajectoires en fonction de leur localisation.....	136
2.5.	Mesure de l'internalisation de la transferrine .....	136
2.5.1.	Marquage des cellules.....	136
2.5.2.	Description du poste et de l'acquisition.....	136
2.5.3.	Analyse .....	137
2.6.	Statistiques .....	137
<b>Résultats</b>	.....	<b>139</b>
<b>1. Recrutement séquentiel de la dynamine aux PRC</b>	.....	<b>139</b>
1.1.	Le protocole ppH est une technique d'imagerie quantitative sur cellules vivantes comparables à la technique conventionnelle d'internalisation de la Tfn .....	139
1.2.	Le recrutement biphasique de la dynamine aux PRC.....	141
1.3.	La dynamine est échangée aux PRC même en l'absence d'activité GTPase .....	147
<b>2. Diffusion des molécules uniques de dynamine</b>	.....	<b>148</b>
2.1.	La dynamine est recrutée et diffuse à la membrane plasmique.....	148
2.2.	La diffusion de la dynamine n'est pas impactée quel que soit l'étape de formation d'un PRC.....	155
<b>3. Rôle des différents domaines de la dynamine</b>	.....	<b>156</b>
3.1.	La délétion de différents domaines de la dynamine entraîne un changement du comportement diffusif .....	156
3.1.1.	Le domaine PH de la dynamine est important pour la scission vésiculaire .....	158
3.1.2.	Le domaine PRD de la dynamine est important pour son recrutement et son immobilisation aux PRC.....	159
<b>Discussion et perspectives</b>	.....	<b>163</b>
<b>1. Le protocole ppH comme test quantitatif de l'EDC dans les cellules</b>	.....	<b>163</b>
<b>2. Recrutement biphasique de la dynamine aux PRC</b>	.....	<b>164</b>
<b>3. Le domaine PRD est important pour le recrutement de la dynamine aux PRC</b>	.....	<b>167</b>
<b>4. Le domaine PH est important pour la scission vésiculaire</b>	.....	<b>169</b>
<b>5. Dynamique d'échange et diffusion des molécules de dynamine aux PRC</b>	.....	<b>171</b>
<b>6. Modèle dynamique du recrutement et de diffusion de la dynamine pendant la formation des PRC</b>	.....	<b>173</b>
<b>Annexes</b>	.....	<b>175</b>
<b>Bibliographie</b>	.....	<b>227</b>

# Index des Tableaux

Tableau 1   Séquences d'internalisation reconnues par AP-2.....	49
Tableau 2   Liste non exhaustive des inhibiteurs de la dynamine et de leur domaine cible.....	91
Tableau 3   Composition des solutions extracellulaires.....	109

# Index des figures

Figure 1   Dessin des premières "cellules" observées dans des coupes d'écorces de liège par Robert Hooke en 1665. Illustration tirée de l'ouvrage intitulé "Micrographia". .....	29
Figure 2   Microscope de Leeuwenhoek.....	30
Figure 3   Les voies du trafic membranaire.....	33
Figure 4   Composition lipidique des compartiments membranaires et les différents domaines de reconnaissance lipidique.....	35
Figure 5   Conversion des protéines Rab.....	36
Figure 6   Localisation sous-cellulaire et fonction des Rab GTPases.....	37
Figure 7   Les multiples voies d'internalisation à la membrane plasmique dans la cellule.....	40
Figure 8   Première observation d'une vésicule d'endocytose par Roth et Porter.....	45
Figure 9   Structure en « panier de basket » de la clathrine.....	46
Figure 10   Etapes de la formation d'une vésicule d'endocytose au cours du temps.....	46
Figure 11   Modules des interactions de l'endocytose dépendante de la clathrine.....	47
Figure 12   Les 5 étapes de la formation d'une vésicule d'endocytose.....	48
Figure 13   Initiation du bourgeonnement membranaire.....	50
Figure 14   Modèles d'assemblage du manteau de clathrine.....	53
Figure 15   Courbure de la membrane.....	54
Figure 16   Modèle d'invagination membranaire par polymérisation d'actine dans la levure.....	56
Figure 17   Allongement des couds vésiculaire suite à la suppression de l'expression de la dynamine.....	57
Figure 18   Exemples d'expériences d'internalisation de la transferrine et d'anticorps.....	63
Figure 19   Profils de recrutement de protéines alignés au moment de la disparition de la clathrine.....	64
Figure 20   Observation des temps de vie des structures de clathrine pour évaluer l'activité d'endocytose et l'effet de son inhibition.....	65
Figure 21   Signatures protéiques et changements morphologiques dû à la formation de vésicules recouvertes de clathrine.....	66
Figure 22   Combinaison de l'imagerie confocale et HS-AFM révèle les changements morphologiques des PRC dans les cellules vivantes.....	68
Figure 23   Le protocole de pH pulsé révèle la dynamique des protéines d'endocytose.....	69
Figure 24   Structure des domaines de la super-famille de la dynamine.....	72
Figure 25   Représentation linéaire de l'organisation des domaines de la dynamine et de sa structure tridimensionnelle.....	73
Figure 26   Représentation des polymères de dynamine.....	75
Figure 27   Exemples de vésicules présentant un « collier » de dynamine autour du cou.....	78

Figure 28   La dynamine entraine la scission du tube lipidique par l'hydrolyse du GTP. ....	79
Figure 29   Modèle de constriction original pour la scission membranaire par la dynamine. ....	79
Figure 30   Reconstruction 3D de tubules lipidiques super-resserrés <sup>K44A</sup> Dyn <sub>GTP</sub> . ....	81
Figure 31   Orientation du domaine BSE par rapport aux dimères des domaines GTPases et modèle d'assemblage de la dyn <sup>GTP</sup> à l'état super-resserré. ....	82
Figure 32   L'inclinaison et l'insertion du PHD peuvent induire l'hémi-fission.....	85
Figure 33   Les cinq modèles princeps proposés dans la fission vésiculaire de la dynamine.....	86
Figure 34   Modèle de désassemblage. ....	87
Figure 35   Modèle de constriction.....	89
Figure 36   Profil de recrutement de la dynamine.....	96
Figure 37   Cellules NIH-3T3 en culture. ....	99
Figure 38   Cellules MEF en culture. ....	99
Figure 39   Définition de l'angle d'incidence critique.....	102
Figure 40   Principe de la microscopie TIRF.....	103
Figure 41   Représentation du protocole ppH.....	104
Figure 42   Poste d'imagerie utilisé pour l'imagerie TIRF et le patch-clamp.....	105
Figure 43   Schéma du trajet optique du microscope TIRF.....	107
Figure 44   Représentation du système de « gâchettes ». ....	108
Figure 45   Schéma d'une pipette thêta. ....	109
Figure 46   Imagerie et dialyse cellulaire simultanées.....	110
Figure 47   Mesure de la fréquence d'endocytose en configuration « cellule attachée » puis en configuration « cellule entière ». ....	111
Figure 48   Poste d'imagerie utilisé pour le couplage du sptPALM et du protocole ppH.....	113
Figure 49   Schéma du trajet optique du microscope TIRF à deux caméras. ....	114
Figure 50   Normalisation et quantification de l'efficacité d'inhibition des différents bloqueurs de l'endocytose. ....	118
Figure 51   Principe du FRAP.....	120
Figure 52   Anatomie d'une courbe FRAP typique. ....	121
Figure 53   Principe du PALM et du sptPALM.....	126
Figure 54   Spectre d'émission et d'absorption de la mEos3.2. ....	127
Figure 55   Description des acquisitions de sptPALM.....	128
Figure 56   Description des acquisitions lors du couplage du sptPALM avec le protocole ppH.....	129
Figure 57   Localisation des molécules individuelles par ajustement gaussien-2D.....	130
Figure 58   Localisations de molécules individuelles. ....	131
Figure 59   Principe de la reconstruction des trajectoires par suivi de molécule individuelle.....	131
Figure 60   Représentation des gaussiennes permettant la séparation des deux comportements diffusifs des molécules de dynamine. ....	134
Figure 61   Analyses de suivie de molécules individuelles. ....	135
Figure 62   Comparaison internalisation de la Tfn et protocole ppH. ....	141
Figure 63   La dynamine1-mCh s'accumule aux cous des puits recouverts de clathrine après inhibition par le dyngo-4a.....	144
Figure 64   Le décaageage du DMNPE-GTPγS inhibe l'EDC en 4 secondes et entraine l'accumulation de dyn2-mCh aux PRC. ....	146

Figure 65   La dynamine1-mCh est réversiblement piégée aux PRC. ....	148
Figure 66   La dynamine1-mEos3.2 est recrutée et diffuse à la membrane plasmique dans les NIH-3T3. ....	152
Figure 67   La dynamine1-mEos3.2 diffuse plus lentement à l'intérieur des PRC de MEF TKO Dynamine. ....	155
Figure 68   La diffusion de la dynamine est la même aux PRC quel que soit le stade de formation de la vésicule. ....	156
Figure 69   La délétion de différents domaines de la dynamine entraîne un changement du comportement diffusif. ....	158
Figure 70   La délétion des domaines PH et PRD impacte la diffusion de la dynamine. ....	161
Figure 71   Modèle dynamique du recrutement et de la diffusion de la dynamine pendant la formation des PRC. ....	174



# Remerciements

Très honorée de leur présence, je tiens d'abord à remercier sincèrement les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail de thèse. Je remercie **Violaine Moreau** et **Nicolas Vitale** d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse en tant qu'examineurs ainsi que **Nathalie Sans** pour avoir accepté de présider cette soutenance. J'aimerais aussi adresser mes remerciements sincères à **Marianne Renner** et **Guillaume Montagnac**, en particulier pour le temps qu'ils ont consacré à lire ce manuscrit et à écrire leur rapport.

Merci à l'**European Research Council** et à la **Région Nouvelle Aquitaine** d'avoir financé ma thèse, ainsi qu'au **LabEx Brain** pour la bourse de prolongation de thèse m'ayant permis de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Je souhaiterais remercier **Daniel Choquet** de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir donné l'occasion de travailler avec des techniques d'imagerie de pointe appliquées au vaste domaine interdisciplinaire des neurosciences. Bien sûr, un grand merci à tous les membres passés et présents de la Choquet Team qui ont compté dans mon parcours et qui rendent cette équipe unique.

Je voudrais remercier grandement mon directeur de thèse, **David Perrais**, pour son encadrement, ses conseils et de m'avoir fait confiance durant ces 3 années de thèse. Travailler à tes côtés m'a permis de développer mon autonomie, ma rigueur ainsi que ma persévérance dans l'apprentissage de la recherche.

Ensuite, je remercie ceux qui m'ont formée dans ce projet. Je commencerai par **Morgane Rosendale** pour m'avoir transmis le savoir et l'art du combo patch-ppH. Je remercie également **Benjamin Compans** et **Eric Hosy** d'avoir été disponibles pour me guider dans les analyses du monde nanoscopique. Je remercie aussi **Corey Butler** à qui je dois beaucoup pour l'analyse des données de sptPALM et pour sa constante bonne humeur et ses nombreux conseils.

Je souhaite remercier particulièrement **Natacha Retailleau**, **Mélanie Dessans** et **Célia Michel** pour avoir été présentes dès le début de mon aventure et avoir toujours été disponibles pour mes nombreuses questions et autres coups de stress au quotidien.

Je remercie le Bordeaux Imaging Center, **Christel Poujol**, **Sébastien Marais**, **Magali Mondin**, **Fabrice Cordelières** et **Patrice Mascalchi** qui ont été toujours disponibles pour m'apprendre et m'expliquer l'art photonique et avec qui j'ai passé de très bons moments d'échange pas uniquement scientifique.

Je tiens à remercier chaleureusement **Rémi Sterling**, **Jessica Gilardin** et **Justine Gautron** pour l'énorme travail qu'ils effectuent au sein de l'institut chaque jour et qui participe à améliorer notre quotidien !

Un grand merci à mes copines les chimistes **Ségoène Antoine**, **Camille Genuer** et **Charlotte Rimbault** pour votre bonne humeur au quotidien, pour les soirées et les fous rires (« *on peut payer sans partir ?* »). Vous êtes des supers nanas !

Je tiens à remercier mes premiers encadrants de stage, **Jean-François Quignard** et **Guillaume Gilbert**, qui m'ont encadré en master 1 alors que je quittais les bancs de la fac et avec qui j'ai réalisé mes premières expériences en laboratoire. C'est avec une note très positive que ma carrière scientifique a démarré grâce à vous.

Je voudrais sincèrement remercier mes deux mentors scientifiques, **Nathalie Sans** et **Mireille Montcouquiol** qui m'ont accueillie en stage de Master 2 en 2015. Vous m'avez initiée à la recherche, vous avez su me transmettre la passion, m'enseigner la rigueur, la persévérance et votre soutien aussi bien scientifique que personnel a été sans faille jusqu'à aujourd'hui. Je vous remercie chaleureusement pour toutes les discussions que nous avons pu avoir, strictement scientifiques ou pas, qui ont toujours su me guider d'une manière ou d'une autre, mais aussi pour vos encouragements constants et d'avoir

fait de moi une personne plus équilibrée et fonctionnelle. Pour tout cela je tiens à vous remercier du fond du cœur.

Je tiens à remercier particulièrement **Magalie Martineau**, mes remerciements pour toi ne seront jamais à la hauteur de l'importance que je porte à ta présence au quotidien depuis le début de cette thèse. Tu as été mon étoile dès le départ. Ton calme, ta patience, ta bienveillance, ton aide précieuse au quotidien, toutes nos discussions, tes conseils scientifiques et tes encouragements indéfectibles m'ont accompagnée tout au long de cette thèse et m'ont permis de grandir scientifiquement et personnellement. Nous avons partagé tellement d'aventures abracadabrantes qui n'auraient jamais eu lieu si nous n'avions pas été embarquées ensemble dans ces congrès, post-congrès et soirées de folie ! Toutes ces aventures ont renforcé notre couple et la routine est un concept que nous n'avons jamais connu. Tu es devenue mon amie et de futures aventures nous attendent, tu es et resteras mon modèle. 🦞

Un grand merci à tous ceux avec qui j'ai partagé chaque jour de mon quotidien et qui ont toujours été présents pour partager les grandes étapes, comme l'IINS meeting devant l'institut, les demandes de financement, l'écriture et la soutenance de thèse, mais aussi les soirées « festives » et les pauses : **Zeynep Karatas** pour ta constante bonne humeur, **Thomas Orré** pour tes jeux de mots magnifiques mais aussi pour tes conseils et ton aide scientifique, **Matthieu Lagardère** pour m'avoir permis de garder la tête froide et pour m'avoir initiée aux joies du FRAP, **Sébastien Benquet**, mon très cher voisin de bureau, tu as été le meilleur voisin de ma vie ! **Camille Saphy**, ma meuf, pour ton esprit vif, tes câlins et ton soutien au quotidien, tu es ma super-héroïne et je t'aime comme ça ! **Konstantina Liouta**, « La Grecque », tu n'es pas faite dans le même moule que tout le monde et c'est ce qui fait de toi quelqu'un d'humainement incomparable, merci pour ta sagesse (et les chocolats). I would like to thank **Ani José Augustine** for his kindness and for the great badminton games after work. Je tiens particulièrement à remercier **Mohammed El Amine Mehidi**, the King of the Wor(l)d, pour son implication totale et son soutien sans faille jusqu'à la fin fin fin. Ta bonne humeur et ton humour ne connaissent pas de limite.

Je remercie du fond du cœur mes amis, **Anthony Sehl**, **Thomas Hivet** et **Mégane Brune** qui ont été compréhensifs et d'un soutien moral sans faille, sans fin et sans jugement. Je vous ai rencontrés sur les bancs de la fac en licence, et depuis, même si la vie professionnelle nous a parsemés, nous sommes restés unis et vous savez à quel point je vous aime fort pour tous les merveilleux moments partagés.

Bien évidemment, je remercie ma famille, et surtout mes parents qui m'ont soutenue tout au long de mes études et de ma thèse.

Je tiens à remercier ma sœur **Karine** et mes neveux **Julianne** et **Léo** qui n'ont pas manqué de me répéter chaque jour que j'allai y arriver et qui ont cru en moi, plus que moi-même. Vous avez été un soutien sans faille et pour tout ça, je vous aime.

**Steven**, obrigado pelo teu apoio sem falhas, o teu bom humor, as piadas que me fazem chorar de rir, a tua paciência, a tua bondade. Estiveste sempre presente, qualquer que fosse a etapa a alcançar e soubeste motivar-me para dar o melhor de mim e exceder-me. Amo o nosso binómio de vida e graças a ti alcancei todas as etapas. Amo-te mais que tudo e mereces o equivalente a uma tese para te agradecer devidamente por tudo aquilo que és e fizeste.

Agradeço igualmente à tua mãe **Célia** por todos os bons pratos portugueses que ela nos preparou e ensinou, assim como a sua hospitalidade e obrigado ao teu irmão **Alexandre** pelo seu bom humor contagiante e o seu entusiasmo permanente.

**Un très grand merci à tous !**





## Résumé

L'endocytose dépendante de la clathrine (EDC), c'est-à-dire la formation de vésicules recouvertes de clathrine (VRC) à partir de la membrane plasmique, est un processus essentiel dans les cellules eucaryotes. Au cours de l'EDC, la GTPase dynamine est recrutée au cou de la VRC naissante où elle s'oligomérisse en hélice. Les changements de conformation induits par l'hydrolyse du GTP catalysent la scission du cou vésiculaire. Ce processus a été étudié en détail par reconstitution *in vitro* sur des tubules membranaires, mais il doit être établi dans des cellules vivantes, où les interactions de la dynamine avec d'autres protéines comme l'amphiphysine sont critiques. L'imagerie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) avec le protocole pH pulsé (ppH) sur cellules vivantes permet la détection de la formation de VRC avec une résolution spatiale (~100 nm) et temporelle (2 s) élevée. Ce protocole a révélé que la dynamine présente un recrutement biphasique aux puits recouverts de clathrine (PRC) en maturation avec un pic au moment de la scission mais les paramètres de son recrutement dans les cellules vivantes restent peu clairs.

Pour déterminer ces paramètres, nous avons utilisé des techniques d'imagerie sur cellules vivantes pour étudier le recrutement de la dynamine à l'échelle globale et à l'échelle de la molécule unique lors de perturbations aiguës de sa fonction. Tout d'abord, nous avons montré que le dyngo-4a, un inhibiteur de l'activité GTPase de la dynamine perméable aux cellules, ou le GTPyS dialysé à l'aide d'une pipette patch-clamp, bloquent rapidement l'EDC et entraînent l'accumulation de dynamine-mCherry aux PRC. Un blocage partiel de cette activité réduit le taux de recrutement de la dynamine avant la formation du PRC, ce qui suggère que l'activité de GTPase régule son recrutement aux premiers stades de la formation du PRC. Nous avons ensuite étudié les paramètres du recrutement de la dynamine pendant la formation des PRC. L'analyse de FRAP montre que l'échange de dynamine est rapide et complet et n'est que modérément altéré par des concentrations saturantes de dyngo-4a, ce qui suggère que la dynamine s'échange avec un pool extra-PRC en continu, y compris quand la dynamine est assemblée en hélice autour du cou vésiculaire. Pour mieux comprendre les modes de recrutement de la dynamine à tous les stades de la maturation des PRC, nous avons couplé le protocole ppH au suivi de particules uniques (sptPALM) dans des cellules exprimant la dynamine-mEos3.2. La dynamine est recrutée à la membrane plasmique, diffuse à l'extérieur des PRC et y est transitoirement piégée. De plus, nous avons déterminé avec des dynamines mutées (1) que le domaine PRD de la dynamine est crucial pour son recrutement aux PRC ; (2) que le domaine PH est important pour la scission vésiculaire mais pas pour son recrutement aux PRC ou à la membrane plasmique. Enfin, le nombre de molécules détectées augmente à mesure que la scission approche, mais leur diffusion est similaire à tous les stades de la maturation des PRC. Nous concluons que la dynamine s'échange en permanence avec un pool extra-PRC, ce qui permettrait son recrutement ultérieur par l'ajout de nouveaux sites de liaison et sa capacité à rétrécir le cou des vésicules suite à l'hydrolyse du GTP.

En conclusion, ces données suggèrent qu'aux PRC, les molécules de dynamine (1) sont constamment échangées ; (2) diffusent à des taux similaires tout au long du processus de formation, maturation et scission des vésicules; et (3) l'activité GTPase de la dynamine contribue à la maturation et à la scission des VRC.



# Abstract

Clathrin-mediated endocytosis (CME), the formation of clathrin-coated vesicles (CCV) from the plasma membrane, is an essential process in eukaryotic cells. During CME, the GTPase dynamin is recruited to the neck of nascent CCV where it oligomerizes into helical filaments. Conformational changes induced by the hydrolysis of GTP catalyze the scission of the vesicle neck. This process has been studied in detail with *in vitro* reconstitution on membrane tubules but it needs to be established in living cells, where interactions between dynamin and other proteins such as amphiphysin are critical. Live cell total internal reflection fluorescence (TIRF) imaging with the pulsed pH (ppH) assay allows the detection of CCV formation with high spatial (~100 nm) and temporal (2 s) resolutions. It has revealed that dynamin is recruited to maturing clathrin-coated pits (CCP) in two phases with a peak at the time of scission but the parameters of its recruitment in living cells remain unclear.

To determine these parameters, we have performed live cell imaging of dynamin recruitment at collective and single molecule levels during acute perturbations of its function. First, we showed that dyngo-4a, a cell permeable blocker of dynamin GTPase activity, or GTP $\gamma$ S dialyzed through a patch-clamp pipette, quickly blocked CME and led to the accumulation of dynamin-mCherry at CCP. Partial block decreased the rate of dynamin recruitment before CCV formation, suggesting that GTPase activity regulates its recruitment at early stages of CCV formation. We next investigated the parameters of dynamin recruitment to forming CCV. FRAP analysis showed that dynamin exchange is fast and complete and was only moderately impaired by saturating concentrations of dyngo-4a, suggesting that dynamin exchanges with an extra-CCP pool at all times, including association in the oligomeric helix around the tubular neck. To get better insight into the modes of dynamin recruitment at all stages of CCP maturation we conducted dual ppH/single particle tracking (sptPALM) imaging in cells expressing dynamin-mEos3.2. Dynamin is recruited to the plasma membrane, diffuses outside of CCP and is trapped at CCP. Furthermore, we determined with mutated dynamins that (1) the PRD domain of dynamin is crucial for its recruitment at CCP; (2) the PH domain is important for vesicular scission but not for recruitment to CCP or to the plasma membrane. Finally, the number of detected molecules increases as scission approaches but single molecules are equally immobilized at all stages of CCP maturation. We conclude that dynamin exchanges with an extra-CCP pool at all times: this would allow for its further recruitment by addition of new binding sites and its ability to narrow the vesicle neck after GTP hydrolysis.

Altogether, these data suggest that in CCP dynamin molecules (1) are constantly exchanged; (2) diffuse at similar rates throughout the entire process of vesicle formation, from maturation until scission; and (3) that dynamin's GTPase activity contributes to CCP maturation and scission.



# Publications et communications

## Publication

Rosendale M., Van T. N. N., Grillo-Bosch D., Sposini S., **Claverie L.**, Gauthereau I., Claverol S., Choquet D., Sainlos M., Perrais D.

*Functional recruitment of dynamin requires multimeric interactions for efficient endocytosis*  
bioRxiv 309245 ; doi: <https://doi.org/10.1101/309245>

## En préparation

**Claverie L.**, Rosendale M., Mascalchi P., Retailleau N., Butler C., Sibarita J-B., Choquet D., Perrais D.  
*Exchange dynamics of dynamin measured in living cells during endocytic vesicle formation*

## Communications affichées

11<sup>ème</sup> Forum de la FENS, Berlin, Allemagne - 2018

**Claverie L.**, Rosendale M., Choquet D., Perrais D.

“Exchange dynamics of dynamin measured in living cells during endocytic vesicle formation”

5<sup>ème</sup> Symposium International Frontiers In Neurophotonics, Bordeaux, France - 2017

**Claverie L.**, Rosendale M., Perrais D.

“Dynamics of the last step of endocytosis, GTP hydrolysis by dynamin, measured in live cells”

NeuroFrance 2017, Bordeaux, France – 2017

**Claverie L.**, Rosendale M., Perrais D.

“Dynamics of the last step of endocytosis, GTP hydrolysis by dynamin, measured in live cells”

Journée de l'école doctorale, Université de Bordeaux, France – 2017

**Claverie L.**, Rosendale M., Perrais D.

“Dynamics of the last step of endocytosis, GTP hydrolysis by dynamin, measured in live cells”

19<sup>ème</sup> congrès du club exocytose-endocytose, Carry-le-Rouet, France - 2016

**Claverie L.**, Rosendale M., Perrais D.

“Intracellular control by patch clamp during imaging of CCV formation in living cells”

## Communications orales

*21<sup>ème</sup> congrès du Club exocytose-endocytose, San Feliu de Guixols, Espagne - 2018*

**Claverie L.**, Rosendale M., Mascalchi P., Retailleau N., Perrais D.

“Dynamics of endocytosis probed by high resolution fluorescence imaging during acute perturbations”

*Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS), CNRS UMR5297, Université de Bordeaux - 2017*

**Claverie L.**

“Dynamics of endocytosis probed by high resolution fluorescence imaging during acute perturbations”

## Formations

*Imagerie optique et enregistrement électrophysiologique en neurosciences*

Atelier technique : Université de Paris Descartes - Mai 2016

*Cours d'anglais écrit et oral*

Université de Talence - Janvier 2016

*Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche*

Formation en ligne, Université de Bordeaux – Janvier 2019

# Abréviations

## - A, B -

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ANTH : AP180 N-terminal Homology  
AP-2 : Adaptator Protein 2  
ARN : Acide Ribonucléique  
BAR : Bin-Amphiphysin-Rvs161/167  
BSE : Bundle Signalling Element

## - C -

CCP : Clathrin Coated Pit  
CCV : Clathrin Coated Vesicle  
CLASP : Clathrin-Associated Sorting Proteins  
CLEM : Correlative Light Electron Microscopy  
CLIC-GEEC : Clathrin-Independent Carrier-Glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins-enriched Early Endosomal Compartment  
COPI : Coat Protein Complex 1  
COPII : Coat Protein Complex 2  
Cryo-EM : Cryogenic Electron Microscopy

## - D -

DLP : Dynamin-Like Proteins  
DNM1 (2,3) : Dynamin 1 (2, 3)  
Dyn5 : Dynamine à pH 5  
Dyn7 : Dynamine à pH 7

## - E, F -

EDC : Endocytose Dépendante de la Clathrine  
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor  
ENTH : The Epsin N-terminal Homology  
FEME : Fast Endophilin-Mediated Endocytosis  
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

## - G -

GAK : Cyclin G Associated Kinase  
GAP : GTPase-Activating Protein  
GD : GTPase Domain  
GDI : GDP Dissociation Inhibitor  
GDP : Guanosine Diphosphate  
GDP•AlF<sub>4</sub> : GDP activated with Aluminium Fluoride  
GED : GTPase Effector Domain  
GFP : Green Fluorescent Protein

GGT : Geranylgeranyl Transferase  
GMPPCP : Guanosine-5'-[ $\beta$ , $\gamma$ ]-methylene]triphosphate  
GPCR : G Protein-Coupled Receptor  
GPI-AP : Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins  
GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase-3  $\beta$   
GTPase : Guanosine Triphosphatase  
GTP : Guanosine Triphosphate  
GTP $\gamma$ S : Guanosine 5'-[ $\gamma$ -thio]triphosphate

## - H, I, J, K, L -

HeLa : Human Epithelial cells  
HBS : HEPES Buffered Saline  
HS-AFM : High-Speed Atomic Force Microscopy  
HSCP70 : Heat Shock Cognate Protein 70  
ICM : Ionic Conductance Microscopy  
IP<sub>3</sub> : Inositol-3-phosphate  
KO : Knock-Out  
LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor

## - M, N, O -

MBS : 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid Buffered Saline  
mCh : mCherry  
MD : Middle Domain  
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast  
MIA : Multidimensional Image Analysis  
NIH-3T3 : Mouse Embryonic Fibroblasts  
OPA1 : Optic Atrophy 1

## - P, Q, R -

PALM : PhotoActivated Laser Microscopy  
PHD : Pleckstrin Homology Domain  
PH : Pleckstrin Homology  
Pi : Phosphate inorganique  
PI : Phosphoinositide  
PLC $\delta$ 1 : 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-1  
ppH : Protocole de pH pulsé  
PRD : Proline-Arginine Rich Domain  
PRC : Puits Recouverts de Clathrine  
RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G  
REP : Rab Escort Protein 1

- S -

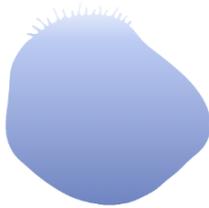
SEP : Superecliptic PHLuorin  
SH3 : SRC Homology 3  
SIM : Structured Illumination Microscopy  
SK-MEL-2 : Skin-Malignant Melanoma-2  
SPT : Single Particle Tracking  
sptPALM : Single-Particle Tracking Photoactivated  
Localization Microscopy  
SRC : Structure Recouverte de Clathrine  
STED : Stimulated Emission Depletion  
STORM : Stochastic Optical Reconstruction  
Microscopy  
SUPER : SUPported lipid bilayers with Excess  
membrane Reservoir  
SVM : Support Vector Machine

- T, U, V, W, X, Y, Z -

Tfn : Transferrine  
TfR : récepteur à la transferrine  
TfR-SEP : Transferrin Receptor coupled to  
Superecliptic PHLuorin  
TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence  
TKO : Triple Knock-Out  
VRC : Vésicule Recouverte de Clathrine







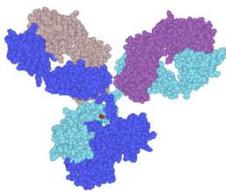
### **La cellule**

La cellule peut être apparentée à un petit ballon contenant du liquide et des solides en suspension. Ces solides en suspension sont appelés des organites et sont constitués de molécules. La taille d'une cellule varie entre 1 et 100 micromètres.



### **L'intérieur de la cellule**

Les organites à l'intérieur de la cellule fonctionnent comme des petits organes ayant chacun un rôle pour maintenir la cellule en vie et lui permettre d'interagir avec son environnement. Ces organites sont composés de diverses petites particules appelées protéines, lipides et glucides.



### **Les protéines**

Les protéines sont des biomolécules polyvalentes et diversifiées constituées d'une chaîne d'acides aminés. Chaque protéine à l'intérieur de la cellule assure une mission spécifique comme réceptionner des messages, assurer le déplacement ou restructurer le squelette et donc la forme de la cellule. Leur taille peut aller de 0,1 à 10 nanomètres (1000 fois inférieur au diamètre d'un cheveu). Ci-contre une représentation d'un anticorps (immunoglobuline G) humain présent dans le sang.

---



# Préambule

Dès l'antiquité, **Aristote** un philosophe grecque avait émis l'hypothèse que les plantes et les animaux sont formés de peu d'éléments qui se répètent dans chacun d'entre eux, si complexes soient-ils. Des siècles plus tard en 1665, grâce à l'invention de la lentille puis du microscope, **Robert Hooke** mis en évidence l'existence de la cellule à l'aide d'un microscope rudimentaire de sa fabrication qu'il utilisa pour observer un morceau de liège. C'est dans un ouvrage intitulé "*Micrographia*" (Hooke, 1665) qu'il nomma "**cellules**" les plus petites unités structurelles de la vie (Figure 1). La découverte de Hooke marqua le début de la **théorie cellulaire**, selon laquelle tous les êtres vivants sont formés de cellules.

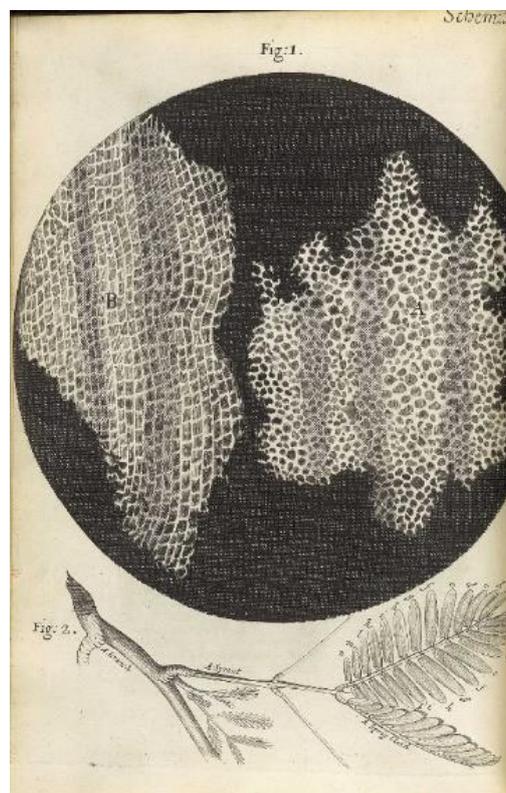


Figure 1 | Dessin des premières "cellules" observées dans des coupes d'écorces de liège par Robert Hooke en 1665. Illustration tirée de l'ouvrage intitulé "*Micrographia*".

Puis en 1673, **Antony Van Leeuwenhoek**, un marchand hollandais, chercheur amateur, inventa le premier **microscope** (Figure 2). Cet instrument lui permit d'agrandir les objets observés avec une précision de focalisation surpassant la résolution des systèmes de lentilles plus primitifs. Ainsi Leeuwenhoek dessina de manière très détaillée de nombreux micro-organismes qu'il avait observés dans de l'eau de pluie.

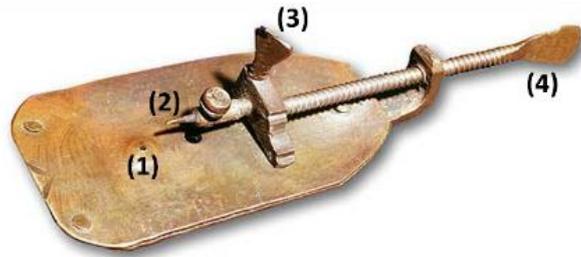


Figure 2 | Microscope de Leeuwenhoek.

Le microscope simple de Leeuwenhoek est composé d'une lentille bi-convexe (1) en verre insérée entre deux plaques de métal, qui permet un grossissement de 70 à 250 fois pour une résolution de 1,5 microns. L'objet à examiner est fixé sur une pointe (2) dont la hauteur et la profondeur se règlent à l'aide de vis (3-4), en utilisant de la glue ou des préparations en verre pour attacher le spécimen et éviter qu'il ne bouge pendant l'observation. L'instrument doit être tenu très près de l'œil, ce qui nécessite un temps d'accommodation pour que l'image se forme nettement.

Source : Adaptée de [www.photoniques.com](http://www.photoniques.com)

D'autres scientifiques utiliseront les microscopes pour étudier les cellules mises en évidence par Hooke et Leeuwenhoek. En 1839, le botaniste **Matthias Schleiden** et le zoologiste **Theodor Schwann**, s'appuyant sur les nombreuses observations de leurs collègues, consolidèrent la **théorie cellulaire**, selon laquelle tous les organismes - qu'ils soient simples comme les bactéries ou complexes comme les plantes et les animaux - sont formés de cellules et de produits cellulaires. Certains d'entre eux sont formés d'une unique cellule autonome (ce sont les organismes unicellulaires), tandis que d'autres sont formés de plusieurs cellules différenciées du point de vue de la forme et des fonctions (ce sont les organismes pluricellulaires).

En 1855, **Rudolf Virchow**, médecin allemand, suggère que toute cellule provient d'une autre cellule, préexistante "*omnis cellula e cellula*".

Les contributions de ces scientifiques ont mené à la définition des grands aspects de la théorie cellulaire :

- La cellule est la plus petite entité vivante
- Tout être vivant est composé de cellules
- Toute cellule provient d'une autre cellule

# Introduction

## 1. Trafic membranaire – Un mécanisme bien organisé

### 1.1. Vue d'ensemble et définitions

La cellule est l'unité fondamentale, fonctionnelle et structurale de base qui compose les tissus et organes des êtres vivants. C'est une entité vivante qui fonctionne de manière autonome, tout en restant coordonnée avec les autres. Les cellules sont capables d'interagir et de communiquer entre elles et leur environnement afin de maintenir leur homéostasie et d'ajuster leur activité aux besoins de l'organisme entier auquel elles appartiennent. Cette communication est basée sur l'émission et la réception de signaux tels que les facteurs de croissance, les hormones, les neurotransmetteurs ou encore les composants de la matrice extracellulaire. La réception de ces signaux se fait via des protéines localisées à la **membrane plasmique**, comme les récepteurs ou les canaux ioniques qui modulent et contrôlent de nombreuses voies de signalisations intracellulaires. Ainsi la régulation de la présence de ces protéines à la surface membranaire est un processus important médié par une multitude de structures membranaires intracellulaires appelées **organites**, reliées entre elles par un échange très dynamique et complexe de leurs constituants protéiques et lipidiques, c'est-à-dire par le **trafic membranaire** (Figure 3).

Le **trafic membranaire** englobe de manière générale le transfert sélectif des protéines et des lipides permettant à toutes ces molécules d'atteindre leur emplacement intracellulaire correct grâce à des systèmes sophistiqués de transport et de libération. Ces systèmes reposent sur le transport de vésicules entre les différents organites d'une même cellule. La membrane source s'invagine progressivement de manière à former un puits, qui se détache pour former une vésicule libre. Cette vésicule est entourée d'une membrane constituée des protéines et lipides destinés à être transportés, et contenant les composés solubles présents dans la lumière du compartiment donneur. La vésicule est ensuite adressée spécifiquement vers la membrane du compartiment receveur, avec laquelle elle fusionne, libérant ainsi son contenu luminal et membranaire.

Parmi les organites intracellulaires se trouvent le **noyau** contenant le matériel génétique ayant pour fonction principale la synthèse d'**acide désoxyribonucléique (ADN)** lors de la division cellulaire et la transcription d'**acide ribonucléique (ARN)** qui sert comme matrice pour la traduction protéique. La membrane nucléaire est en continuité avec celle du **réticulum endoplasmique**. Le réticulum endoplasmique est un lieu essentiel de synthèse et de maturation des protéines cytosoliques et

membranaires, où elles sont repliées et assemblées avant d'être transportées vers l'**appareil de Golgi** via des vésicules générées par le **complexe protéique de l'enveloppe II (COPII)**. Les protéines ainsi que les lipides sont ensuite modifiés dans l'appareil de Golgi par des glycosylations et phosphorylations. Puis ces protéines modifiées sont de nouveau transportées dans différentes vésicules en fonction de leur localisation finale : certaines vésicules formées par le **complexe protéique I (COPI)** retourneront au réticulum endoplasmique ; d'autres fusionnent avec les **lysosomes** pour maintenir l'environnement acide et la présence d'enzymes hydrolytiques dans ce compartiment, spécialisé dans la dégradation des protéines ; d'autres sont arrimées à la membrane plasmique pour être exocytées sur demande lors d'une stimulation ; certaines sont constitutivement transportées et fusionnent avec la membrane plasmique laissant ainsi les protéines et lipides qu'elles contiennent diffuser à la membrane ; enfin d'autres vésicules fusionnent avec des **endosomes précoces** qui constituent des plateformes de tri pouvant décider du sort des protéines (Figure 3). Le trafic membranaire depuis le réticulum endoplasmique jusqu'aux lysosomes et endosomes est dénommé le trafic antérograde. Les endosomes précoces sont également une étape intermédiaire de la voie inverse à la sécrétion, lorsque les protéines, lipides et autres molécules sont transportés de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule par **endocytose**. Les protéines et les lipides contenus dans les endosomes précoces sont de nouveau transportés via des vésicules vers les lysosomes pour être dégradés, ou vers les **endosomes de recyclage** afin d'être ramenés à la membrane plasmique pour être réutilisés (Gruenberg, 1993; De Matteis and Luini, 2011; Tooze et al., 2015). Ce trafic inverse à la direction du trafic sécrétoire se dénomme trafic rétrograde.

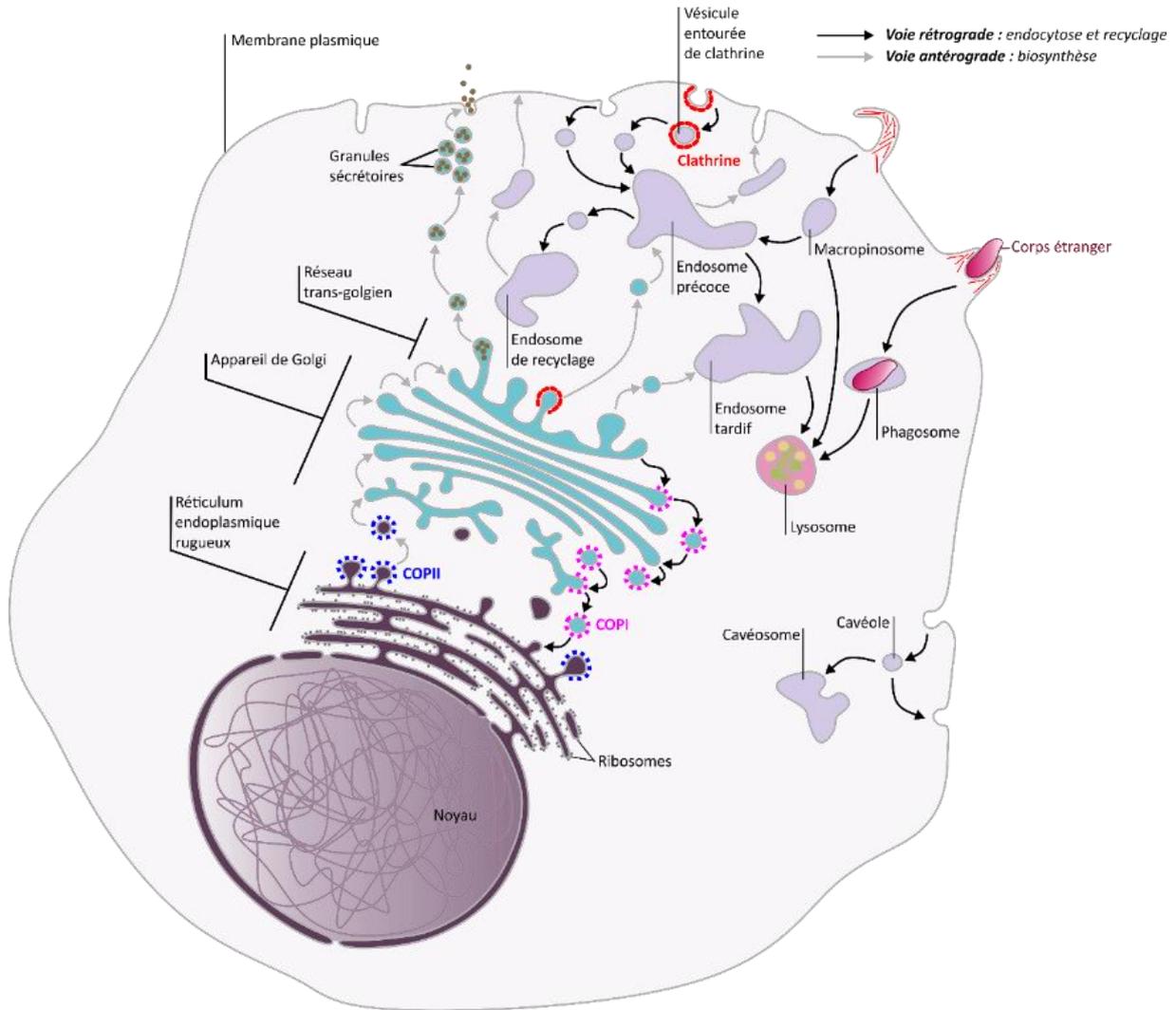


Figure 3 | Les voies du trafic membranaire.

Le trafic vésiculaire se produit entre divers compartiments cellulaires : le transport est dit antérograde lorsque les vésicules trafiquent du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique où elles fusionneront avec cette dernière par exocytose. Le transport est dit rétrograde lorsque les vésicules sont formées à partir de la membrane plasmique par endocytose, pour recycler les protéines membranaires vers les endosomes ou les lysosomes. Certaines vésicules ont besoin de protéines d'enrobage telles que COPI, COPII, cavéoline ou clathrine pour leur formation alors que d'autres semblent capables de faire des protrusions ou invagination membranaire sans avoir recours à des protéines pour former un manteau. Les agents pathogènes comme les bactéries sont internalisés par phagocytose pour ensuite être digérées dans les lysosomes.

Source : Inspirée de De Matteis and Luini, 2011

## 1.2. Marqueurs du trafic membranaire et régulateurs

Les vésicules sont des structures membranaires très dynamiques qui fusionnent constamment et se forment par fission. Elles sont activement transportées par des protéines motrices (myosine, dynéine et kinésine) qui propulsent les vésicules à travers la cellule le long des microtubules et des filaments d'actine. Malgré la diversité des voies intracellulaires, la distribution et la dynamique des macromolécules cellulaires sont hautement organisées et régulées. L'exactitude de ce trafic dépend

de la reconnaissance correcte des organites. En général, les organites sont identifiés par leurs Rab GTPases activées et les espèces lipidiques spécifiques qu'ils présentent (**phosphoinositides**). Ces déterminants labiles et de courte durée confèrent aux organites une identité à la fois unique et souple.

### 1.2.1. Rôle des phosphoinositides dans le trafic membranaire

Les membranes cellulaires des organites sont composées d'une variété de lipides comme le cholestérol, les céramides et les phospholipides. Les **phosphoinositides** (PIs) sont les principaux chefs d'orchestre du contrôle du transport vésiculaire intracellulaire. Les PIs sont des dérivés phosphorylés des phosphatidylinositols, un type de lipide amphipathique dont la tête polaire est composée d'un inositol qui peut être réversiblement phosphorylé aux positions 3, 4 et/ou 5. Ces PIs peuvent être classés en dérivés mono-, di- et triphosphorylés. La famille des PIs comprend 7 combinaisons différentes qui ont toutes été observées *in vivo* : PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> et PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Nadiminti et al., 2018).

La quantité et la distribution spatiale et temporelle des PIs dans la cellule varient considérablement. Les formes majoritaires de PIs sont le PI(4)P et PI(4,5)P<sub>2</sub> alors que le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> semble indétectable dans les cellules non stimulées. Le PI(4)P est à la fois présent dans la membrane de l'appareil de Golgi (Di Paolo and De Camilli, 2006) et dans la membrane plasmique. Le PI(4,5)P<sub>2</sub> est présent dans la membrane plasmique. D'autres sont produits rapidement et de façon transitoire en réponse à l'activation de récepteurs de surface cellulaire et d'autres stimuli. PI(3,4)P<sub>2</sub> et PI(3,4,5)P<sub>3</sub> transmettent des signaux à travers la membrane plasmique, généralement en formant deux messagers intracellulaires : l'inositol-3-phosphate (IP<sub>3</sub>) et le diacylglycérol (DAG). Le PI(3)P est présent au niveau des endosomes précoces et est reconnu par une large gamme de protéines membranaires périphériques qui jouent un rôle clé dans la fonction endosomale (Figure 4).

Les niveaux et le renouvellement des PIs sont étroitement contrôlés par un grand nombre d'enzymes spécifiques. Trouvés exclusivement du côté cytosolique des bicouches membranaires, les PIs sont facilement accessibles aux kinases et phosphatases qui sont capables respectivement d'ajouter et d'éliminer les groupes phosphate ; et aux phospholipases qui clivent les lipides. Comme ces enzymes modificatrices de PIs sont localisées de façon hétérogène dans la cellule, les PIs sont regroupés dans des membranes intracellulaires distinctes et chaque forme de PIs sert donc essentiellement de marqueur d'un organite. Par exemple la membrane plasmique est enrichie en PI(4,5)P<sub>2</sub>, tandis que les PI(4)P et PI(3)P sont détectés principalement dans les endosomes précoces et l'appareil de Golgi. La distribution unique des PIs permet de fournir le mécanisme permettant d'ajuster avec précision le flux

du trafic membranaire et de contrôler la séquence appropriée des évènements de signalisation (Behnia and Munro, 2005).

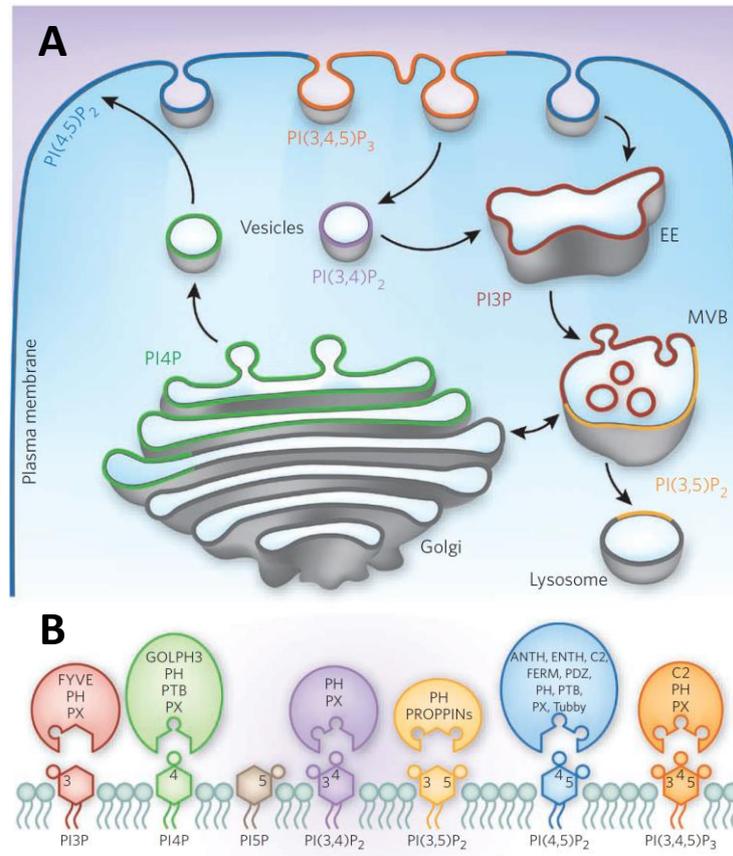


Figure 4 | Composition lipidique des compartiments membranaires et les différents domaines de reconnaissance lipidique.

**(A)** Localisation intracellulaire des PIs. La membrane plasmique est principalement enrichie en PI(4,5)P<sub>2</sub> tandis que les endosomes précoces (EE) sont principalement enrichis en PI(3)P. Les corps multivésiculaires (MVB) sont enrichis à la fois de PI(3)P et de PI(3,5)P<sub>2</sub>. **(B)** De nombreuses protéines impliquées dans le trafic membranaire présentent des domaines de reconnaissance aux lipides. Certains de ces domaines comme les domaines PH et PX reconnaissent tous les PIs. D'autres sont spécifiques d'un PI donné comme les domaines ANTH et ENTH pour le PIP<sub>2</sub> ou le domaine FYVE pour les PIP<sub>3</sub>. Les PIs sont représentés par des têtes hexagonales phosphorylées aux positions 3,4 et/ou 5.

Source : Adaptée de Kutateladze, 2010

### 1.2.2. Rôle des Rab dans le trafic membranaire

Les protéines Rab sont également très importantes dans le trafic vésiculaire. Les Rab GTPases forment une grande famille de petites GTPases. Elles fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui alternent entre deux états conformationnels : la forme active liée au GTP (guanosine triphosphate) et la forme inactive liée au GDP (guanosine diphosphate) (Figure 5). Les Rab sont associées de façon réversible aux membranes et sont localisées dans des membranes intracellulaires distinctes, ce qui est intrinsèque à leur rôle dans la régulation du trafic membranaire (Figure 6). La conversion de l'état lié au GDP en une forme liée au GTP est catalysée par un facteur d'échange nucléotidique de la guanine (GEF) et provoque un changement de conformation des Rab. La conformation active liée au GTP est reconnue par de multiples protéines effectrices et est convertie par hydrolyse du GTP en une forme inactive liée au GDP qui est stimulée par une protéine activatrice de GTPase (GAP) (Figure 5). Les réarrangements conformationnels lors de leur liaison au GTP confèrent aux Rab la capacité de recruter une grande variété d'effecteurs. Les effecteurs de Rab sont impliqués dans tous les aspects du trafic membranaire tels que le bourgeonnement, le désassemblage du manteau, la mobilité et la fusion des vésicules (Stenmark, 2009). Il est également intéressant de noter que les Rab GTPases sont impliquées dans la régulation des PIs présents dans des microdomaines membranaires en recrutant des kinases et phosphatases qui régulent leurs métabolismes (Christoforidis et al., 1999; Fukuda et al., 2008).

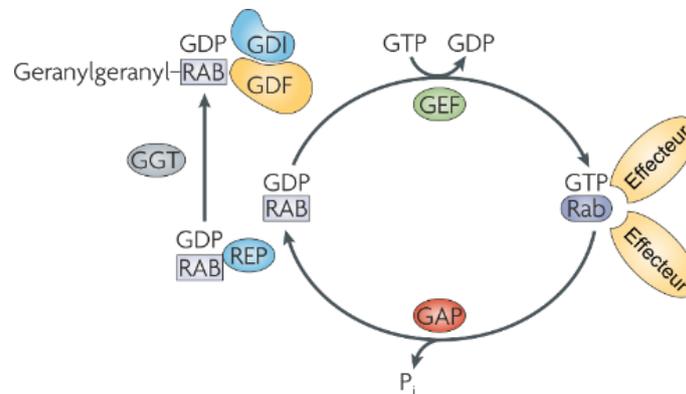


Figure 5 | Conversion des protéines Rab.

La protéine Rab nouvellement synthétisée, sous la forme liée au GDP, est reconnue par une protéine d'escorte de Rab (REP). Le REP présente la protéine Rab à une géranylgeranyl transférase (GGT), qui ajoute un groupe géranylgeranyl sur un ou deux résidus cystéine carboxy-terminaux de la protéine Rab. La protéine Rab liée au GDP et géranylgeranylée est reconnue par l'inhibiteur de dissociation du GDP (GDI), qui régule le cycle membranaire de la protéine Rab. Le ciblage du complexe Rab-GDI sur des membranes spécifiques est médié par l'interaction avec un facteur de déplacement GDI lié à la membrane (GDF).

Source : Adaptée de Stenmark, 2009

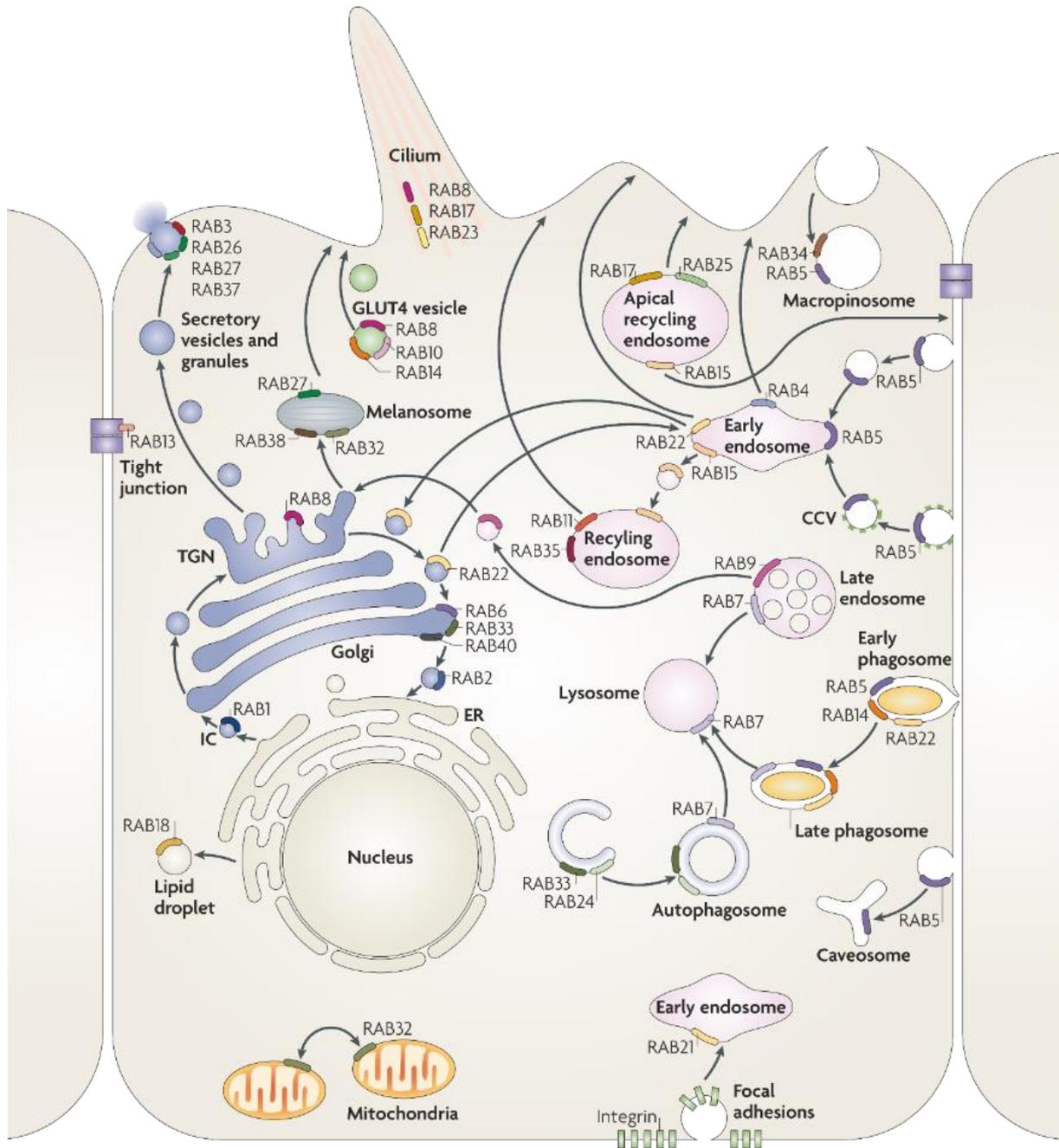


Figure 6 | Localisation sous-cellulaire et fonction des Rab GTPases.

La famille des Rab GTPases spécifie l'identité des organites intracellulaires. Elles sont impliquées dans l'acheminement des vésicules d'un compartiment à l'autre en recrutant des effecteurs, pour leur localisation subcellulaire correcte. Par exemple Rab1 et 2 régulent le trafic du réticulum endoplasmique vers le Golgi. Rab8 est localisée au niveau du réseau trans-golgien et régule l'exocytose. Rab5 se trouve dans les vésicules nouvellement endocytées et dans les endosomes précoces avec Rab4 qui, à son tour, est responsable du recyclage rapide des vésicules à la membrane plasmique. D'autre part, Rab11 et 35 se trouvent sur les endosomes de recyclage et régulent le recyclage lent. Rab 15 régule le trafic des endosomes précoces vers les endosomes de recyclage, tandis que les Rab7 et 9 se trouvent sur les endosomes tardifs et régulent leurs maturations vers le lysosome.

Source : Stenmark, 2009

### 1.3. Endocytose et trafic membranaire

Les organismes cellulaires ont développé une vaste gamme de mécanismes pour transporter les substances à travers les membranes cellulaires. Bien que cela puisse parfois se produire passivement (par exemple par osmose et diffusion), le **transport actif** (en utilisant, par exemple, des gradients électrochimiques ou des pompes à membrane spécialisées) est souvent nécessaire. Des particules ou des volumes de fluide relativement importants peuvent être déplacés à l'aide d'un type particulier de transport actif qui implique la création de petites **vésicules membranaires**. C'est ce qu'on appelle soit l'endocytose lorsque le matériel est amené à l'intérieur des cellules, soit l'exocytose lorsque le matériel interne est déplacé vers l'extérieur.

La régulation de la présence des protéines à la surface membranaire est un processus important médié par un équilibre dynamique entre deux mécanismes : l'exocytose et l'endocytose. **L'endocytose**, du grec « endon » (à l'intérieur) et « kutos » (cellule), désigne le processus par lequel la cellule internalise des substances, protéines, lipides extracellulaires ou membranaires, regroupés sous le terme de **cargo**, par l'intermédiaire de vésicules ou de tubules dérivés de la membrane plasmique. Les cargos à internaliser apparaissent d'abord dans les endosomes précoces situés au voisinage de la membrane plasmique. A partir de là, les cargos sont soit rapidement recyclés vers la surface cellulaire, comme c'est le cas pour plusieurs récepteurs, soit transportés vers les endosomes tardifs, localisés dans la région périnucléaire près du golgi pour être dégradés (Benmerah and Lamaze, 2002).

L'endocytose fut mise en évidence pour la première fois en 1964 par Roth et Porter qui ont suivi l'internalisation de protéine de sang dans les ovocytes de moustique femelle. En effet, après la pique, ces protéines forment des agrégats denses visibles en microscopie électronique (Roth and Porter, 1964). Ces invaginations caractéristiques ont par la suite été décrites dans de nombreux contextes cellulaires comme l'internalisation des récepteurs aux protéines de liaison des lipoprotéines (LDLR) étudiées par Michael Brown et Joseph Goldstein, prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1985 (Anderson et al., 1977; Brown and Goldstein, 1986).

De nombreuses voies d'endocytose coexistent dans les cellules. Leurs mécanismes moléculaires ainsi que les cargos internalisés sont très variables et nécessitent l'implication d'acteurs moléculaires différents. Cependant, l'ensemble de ces voies d'endocytose possèdent des effecteurs en commun et mènent toutes à la fusion éventuelle de la vésicule nouvellement formée avec un endosome précoce.

### 1.3.1. Les différents modes d'endocytose

L'**endocytose** consiste d'abord à remodeler la membrane cellulaire pour former une vésicule contenant le matériel externe. Cette vésicule est ensuite séparée de la membrane plasmique pour être transportée dans le cytoplasme (Figure 7). Ce processus fascinant se produit sous un certain nombre de formes différentes, basées sur la taille des vésicules, le comportement exact de la membrane cellulaire et les protéines impliquées. Bien qu'il y ait peu de consensus sur le nombre exact de formes distinctes (Doherty and McMahon, 2009) l'endocytose peut être divisée en 3 catégories. Le premier type d'endocytose est la **phagocytose**, qui implique l'internalisation de particules solides relativement grandes. Le second type nommé la **macropinocytose**, est utilisé pour l'internalisation de liquide et est donc souvent appelé "boisson cellulaire". La phagocytose et la macropinocytose forment des protrusions membranaires qui entourent le cargo à endocyter. Le dernier type est la **micropinocytose** qui implique la formation de vésicules stéréotypées relativement petites (généralement ~100 nm) qui se forment par invagination membranaire plutôt que par protrusion de membrane. La micropinocytose peut être catégorisée par les acteurs moléculaires impliqués dans l'étape d'internalisation, notamment selon que la formation des vésicules nécessite ou non la présence d'une protéine d'enveloppe. Après leur formation, ces vésicules convergent pour fusionner avec les compartiments endosomaux de tri. Au sein de la micropinocytose, 3 sous-catégories d'endocytose ont pu être mises en évidence : l'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles, l'endocytose dépendante des cavéoles et l'endocytose dépendante de la clathrine (EDC).

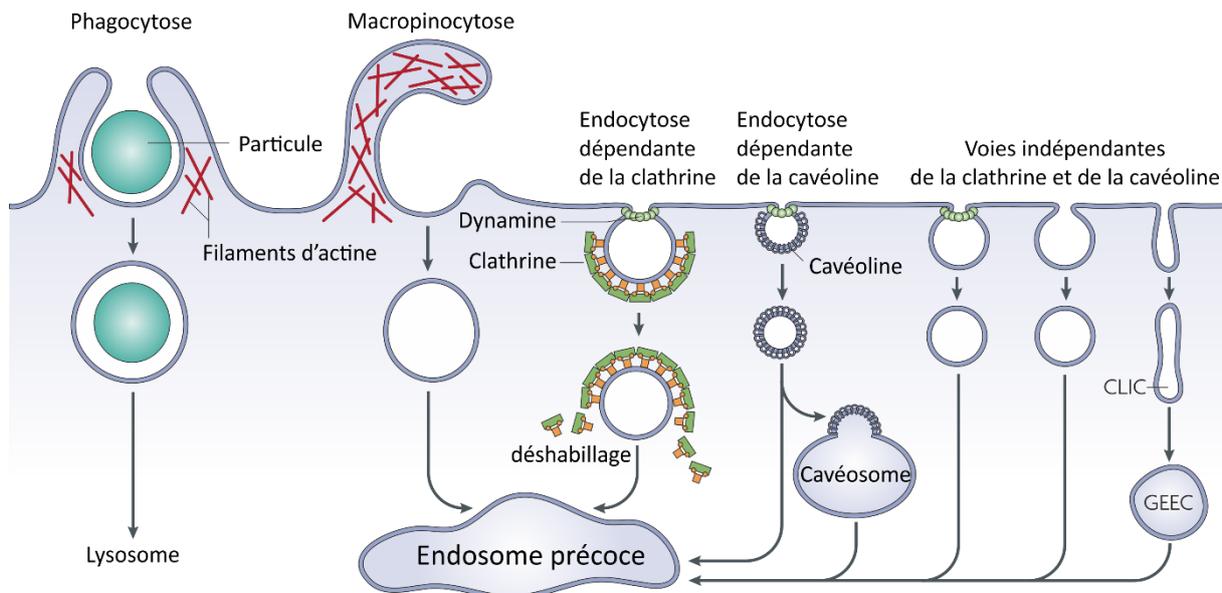


Figure 7 | Les multiples voies d'internalisation à la membrane plasmique dans la cellule.

La phagocytose est spécialisée dans l'absorption de grosses particules telles que les bactéries ou les débris cellulaires, alors que la pinocytose désigne à l'origine l'absorption de liquide. Cependant, la plupart des mécanismes non seulement internalisent des composants purement extracellulaires tels que les nutriments et les enzymes, mais permettent également l'internalisation des protéines liées aux membranes et des lipides membranaires. Les différentes formes d'endocytose sont définies par leurs acteurs moléculaires et sont caractérisées par la nature de leur cargo ainsi que la taille des vésicules formées.

Source : Mayor and Pagano, 2007

### 1.3.1.1. Phagocytose

La phagocytose (du grec « *phagein* » manger et « *kutos* » cellule) est typiquement définie comme l'engloutissement à l'intérieur de la cellule de grosses particules de plus de 0,5 µm pouvant aller jusqu'à des particules de 20 µm ou même plus grandes (Cannon and Swanson, 1992). C'est un mécanisme crucial à la fois pour les organismes unicellulaires comme les ciliés, où la phagocytose est utilisée pour acquérir des nutriments ; et pour les organismes dotés de systèmes immunitaires complexes, où elle est à la fois une méthode pour détruire les éléments étrangers (comme les bactéries ou les virus) et éliminer les débris cellulaires (comme les cellules post-apoptotiques). Le processus de base de la phagocytose est le suivant : les ligands de la particule cible se fixent aux récepteurs de la membrane cellulaire. Les récepteurs liés activent une signalisation intracellulaire qui recrute l'actine et conduit à un enroulement graduel de la membrane plasmique autour de la cible, ce qui forme la « coupe phagocytaire » (Harrison and Grinstein, 2002; May and Machesky, 2001; Rougerie et al., 2013). L'actine recrutée dans la coupe phagocytaire est susceptible de contribuer à la force qui pousse la membrane autour de la cible (Diakonova et al., 2002). Enfin, les myosines (protéines motrices de l'actine) jouent un rôle important dans la fermeture de la coupe phagocytaire à la fin de l'engloutissement (Swanson et al., 1999). Une fois que la membrane se referme autour de la particule, celle-ci se trouve complètement à l'intérieur de la cellule dans un compartiment membranaire appelé phagosome. L'activité de la dynamine, une grande GTPase dont je parlerai en détail plus loin dans ce manuscrit, est considérée comme médiatrice de la réaction de fission menant à la création du phagosome (Gold et al., 1999). L'étape finale de la phagocytose commence par le changement progressif de la composition de la membrane du phagosome pour former le phagosome mature. Celui-ci peut alors fusionner avec les lysosomes, un organite qui contient une multitude d'enzymes digestives (enzymes lytiques et des espèces réactives de l'oxygène), de sorte que le phagosome devient très acide. Enfin, les enzymes digestives dégradent la cible marquant la fin de la phagocytose (Nüsse, 2011).

### 1.3.1.2. Macropinocytose

La macropinocytose (du grec « *macro* » grand, « *pino* » boire et « *kutos* » cellule) implique l'absorption de grandes quantités de liquide et de solutés via la formation de vésicules hétérogènes de grande taille

(0,5-5 µm) appelées macropinosomes. Au niveau moléculaire, elle est plutôt caractérisée par ce qui ne la régle pas que par ce qui la régle. Elle ne présente en effet aucune spécificité de cargo, le macropinosome est dépourvu de protéines d'enveloppe et le mécanisme de fermeture de la membrane est actuellement inconnu. Néanmoins, on sait que la macropinocytose est grandement améliorée par la présence de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire et qu'elle présente de nombreux points communs avec la phagocytose, comme le besoin d'actine et de régulateurs de l'actine ainsi que l'importance du PI(3)P lipidique (Jones, 2007). La non spécificité de la macropinocytose en fait une voie d'entrée privilégiée pour plusieurs pathogènes comme certains virus (VIH, HSV, adénovirus) (Mercer and Helenius, 2009).

### 1.3.1.3. L'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles

Je commencerai par décrire les voies de la micropinocytose, indépendantes des deux protéines d'enveloppe bien caractérisées, la clathrine et la cavéoline. Cette voie englobe vraisemblablement plusieurs voies distinctes mais il est difficile de les caractériser totalement car elles pourraient dépendre des types cellulaires dans lesquelles elles sont décrites et ne font souvent l'objet que d'un petit nombre d'études. La plus étudiée de ces voies est la voie **CLIC-GEEC** (clathrin-independent carrier-glycosyl phosphatidylinositol-anchored proteins-enriched early endosomal compartment), initialement identifiée comme la voie d'entrée de la toxine du choléra (Kirkham et al., 2005). Les vésicules qui se forment par cette voie convergent vers des compartiments intracellulaires concentrés en protéines ancrées par GPI (GPI-APs). Faute d'autres acteurs moléculaires identifiés, cette voie d'endocytose est mieux décrite comme formant des compartiments indépendants de la clathrine (CLIC) qui fusionnent avec les compartiments endosomaux précoces (GEEC) enrichis en GPI-AP. En raison de l'absence d'une couche sphérique rigide autour de la membrane invaginée, des structures tubulaires sont observées. Elles ne semblent pas nécessiter de protéines d'enveloppe et l'implication de la dynamine dans la fission membranaire n'est pas claire (Doherty and McMahon, 2009). Elle semble jouer un rôle important dans la motilité cellulaire, du moins dans certaines conditions (Howes et al., 2010).

D'autres voies indépendantes de la clathrine et de la cavéoline sont la voie dépendante de **l'Arf6** qui permet l'internalisation des protéines de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH, impliqué dans le système immunitaire) et la voie dépendante de la **flottiline** qui permet l'internalisation des protéoglycanes (composants de la matrice extracellulaire) (Doherty and McMahon, 2009; Mayor and Pagano, 2007). Il est intéressant de noter que ces formes d'endocytose pourraient être initiées par des invaginations induites par des facteurs extracellulaires, tels que des pathogènes comme la toxine B de Shiga (Römer et al., 2007) ou le virus SV40 (Ewers et al., 2010), et

des lectines endogènes (Lakshminarayan et al., 2014), ce qui rend la tâche pour définir ces voies d'internalisation encore plus complexe.

Enfin, une nouvelle voie d'endocytose connue sous le nom de **FEME** (Fast Endophilin-Mediated Endocytosis), qui signifie endocytose rapide dépendante de l'endophiline, a récemment été décrite comme formant des invaginations tubulaires enrobées d'endophiline. Elle semble être responsable de l'internalisation indépendante de la clathrine de cargos tels que les récepteurs activés  $\beta$ 1-adrénergiques, les récepteurs interleukine-2 et la toxine du choléra, sur une échelle de temps de quelques secondes (Boucrot et al., 2015; Watanabe and Boucrot, 2017). Elle serait également une voie d'endocytose importante des vésicules synaptiques, qui est largement indépendante de la clathrine (Soykan et al., 2016; Watanabe and Boucrot, 2017; Watanabe et al., 2014). La participation de l'endophiline à une voie d'endocytose indépendante de la clathrine était quelque peu surprenante car l'endophiline était surtout caractérisée comme participant à la formation des vésicules recouvertes de clathrine.

#### 1.3.1.4. Endocytose dépendante de la cavéoline

Les cavéoles, du latin « petites grottes », sont des invaginations en forme de bulbe de 50 à 100 nm de la membrane plasmique. Initialement découvertes par microscopie électronique dans les membranes plasmiques des cellules endothéliales des capillaires sanguins (Palade, 1953), les cavéoles ont été identifiées dans une variété de tissus et de types cellulaires, notamment dans les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les myoblastes et les adipocytes (Hansen et al., 2013; Parton and Del Pozo, 2013). Les cavéoles sont enrobées de cavéolines oligomérisées et de complexes de cavines et sont enrichies en cholestérol et en sphingolipides. Les cavéoles sont des structures assez stables mais qui peuvent être perturbées par l'épuisement du cholestérol qui interfère avec l'interaction cavéoline/cavine (Parton and Del Pozo, 2013). Des protéines accessoires permettent la sculpture des cavéoles. En particulier, une protéine F-BAR, la PACSIN-2 aussi appelé Syndapin2 régule la courbure de la membrane pour sculpter les cavéoles (Ariotti and Parton, 2013; Hansen and Nichols, 2010; Hansen et al., 2011; Hill et al., 2008; Kovtun et al., 2014, 2015; Ludwig et al., 2013; Moren et al., 2012; Senju et al., 2011; Stoeber et al., 2012). La contribution des cavéoles pour l'endocytose globale est minimale (Bitsikas et al., 2014; Kirkham et al., 2005; Thomsen et al., 2002). En effet, la quantification du flux endocyttaire dans les cellules NIH-3T3 qui expriment de façon endogène la cavéoline 1 et la cavine 1 marquées a révélé que seulement 5% environ de la population totale de cavéoles subissent une endocytose. Cette endocytose dépendante de la dynamine conduit au recyclage par exocytose des cavéoles vers la membrane plasmique, ou à leur ciblage vers les endosomes tardifs pour dégradation. Cette stabilité intrigante des cavéoles suggère qu'elles sont nécessaires à l'organisation de lipides

particuliers au niveau de la membrane plasmique. Ainsi, les cavéoles influencent la transduction de signal en régulant la localisation des récepteurs de signalisation dans les microdomaines riches en cholestérol et en sphingolipides, appelés radeaux lipidiques, à la membrane plasmique (Ariotti et al., 2014; Parton and Del Pozo, 2013; Prior et al., 2003). Il a été également démontré qu'une fois formées, les cavéoles peuvent s'aplatir en réponse à l'étirement de la membrane et donc servir de réservoir membranaire, régulant ainsi la tension membranaire (Gervasio et al., 2011; Sinha et al., 2011). Grâce à des approches variées, l'importance des cavéoles dans de nombreuses fonctions cellulaires est mieux connue et on pense qu'elles jouent différents rôles pour la transduction de signal, l'endocytose, l'invasion des pathogènes, l'homéostasie lipidique et la mécanotransduction (Ariotti and Parton, 2013; Cheng and Nichols, 2016; Hansen and Nichols, 2010; Parton and Del Pozo, 2013; Parton and Simons, 2007).

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

L'endocytose dépendante de la clathrine (EDC) est de loin la voie d'endocytose la plus étudiée et la mieux comprise. Selon une étude récente, elle représenterait même la seule voie d'endocytose utilisée par les cellules pour l'internalisation de cargos dans des conditions normales (Bitsikas et al., 2014). Il s'agit d'une voie d'endocytose fondamentale dont les mécanismes de régulation sont grandement conservés chez les eucaryotes, de la levure aux mammifères. L'absorption de matière à l'intérieur de la cellule a été visualisée pour la première fois après l'introduction de la fixation au glutaraldéhyde dans les années 1960 qui, combinée à l'acquisition d'images par microscopie électronique, a permis la visualisation de vésicules enveloppées de protéines dans de nombreux tissus (Rosenbluth, 1964; Roth and Porter, 1964). L'EDC était appelée à l'origine endocytose à médiation par les récepteurs (Brown and Goldstein, 1986), mais ce terme a été abandonné car de plus en plus de récepteurs étaient internalisés par des voies indépendantes de la clathrine. Les PRC s'assemblent à la membrane plasmique qui s'invagine ensuite pour former des vésicules recouvertes de clathrine de tailles allant de 80 nm dans le cerveau à 150 nm dans d'autres cellules de mammifères (McMahon and Boucrot, 2011). Cette voie est connue pour être responsable de l'internalisation d'une variété de récepteurs de signalisation, tels que de nombreux GPCR (G protein-coupled receptor) et les récepteurs des facteurs de croissance, les canaux ioniques, tels que les aquaporines et les récepteurs AMPA, et d'autres protéines transmembranaires comme les intégrines et les récepteurs tyrosine kinases. Elle est aussi spécifiquement impliquée dans l'internalisation du récepteur de la transferrine (TfR), ce qui fait de ce dernier un bon marqueur pour l'étude de l'EDC. Étant impliqué dans tant de fonctions cellulaires, il n'est pas surprenant que la EDC soit fortement régulée par une multitude d'interactions moléculaires. Il s'agit notamment des protéines adaptatrices (par exemple AP-2, AP-180/CALM) qui, combinées à la

clathrine, forment le manteau autour de la vésicule, et des protéines de tri associées à la clathrine (CLASP) qui aident à la sélection spécifique des cargos (Traub, 2009). Les mécanismes moléculaires induisant l'invagination membranaire aux PRC sont encore mal compris, mais on sait qu'ils impliquent le recrutement de protéines contenant le domaine BIN-Amphiphysine-Rvs167 (BAR). Les dimères de ces protéines forment des structures en forme de banane censées détecter et/ou induire une courbure sur la membrane à laquelle elles se lient (Qualmann et al., 2011). Quant à la scission finale de la vésicule de la membrane, il n'y a pas de controverse sur la nécessité de la dynamine (Robinson, 1994; Roux et al., 2006a). Enfin le PI(4,5)P<sub>2</sub> est ensuite transformé en PI(3)P par des PI phosphatases comme la synaptojanine et OCRL et les vésicules sont déshabillées de leur manteau protéique avant d'être fusionnées avec les endosomes précoces. Les mécanismes de régulation de l'EDC faisant l'objet principal d'étude de ma thèse, ils seront décrits en détail dans le chapitre suivant.

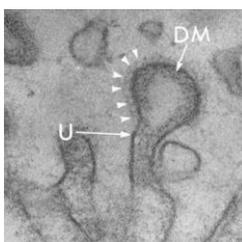
## 2. L'Endocytose Dépendante de la Clathrine

L'endocytose génère de petites vésicules membranaires (60-120 nm) qui transportent diverses molécules de la membrane plasmique des cellules eucaryotes dans le cytoplasme. La cargaison se compose principalement de protéines transmembranaires et de leurs ligands extracellulaires (regroupées sous le terme de **cargo**). L'endocytose contrôle ainsi la composition lipidique et protéique de la membrane plasmique, et régule donc l'interaction des cellules avec leur environnement (Doherty and McMahon, 2009). De multiples voies d'endocytose différentes ont été décrites dans les cellules eucaryotes («

Les différents modes d'endocytose » p39), mais la principale voie pour l'internalisation de nombreuses cargaisons est l'endocytose dépendante de la clathrine (EDC). Ce mécanisme cellulaire a captivé les biologistes cellulaires pendant plus de cinquante ans. Les nombreuses fonctions dans lesquelles l'endocytose joue un rôle, comme l'absorption de nutriments, l'entrée des pathogènes, la régulation des récepteurs à la membrane, et la transmission synaptique, ont suscité cet intérêt. La compréhension des mécanismes morphologiques et biochimiques de base qui permettent à des vésicules de se former, de choisir sélectivement les composés à y inclure ou encore comment les composants de la surface cellulaire sont sélectivement inclus dans ces vésicules, ou comment la membrane et le contenu des vésicules sont délivrés aux compartiments intracellulaires, sont l'objet d'une recherche très active (Haucke and Kozlov, 2018; Marsh and McMahon, 1999; Sochacki and Taraska, 2018).

### 2.1. Découverte de l'endocytose dépendante de la clathrine

Roth et Porter ont découvert les vésicules entourées d'un « manteau » protéique au cours de l'étude de l'absorption des protéines du sang par les ovocytes de moustique (Figure 8). Ils ont observé des invaginations membranaires (des puits) et des vésicules détachées de la membrane avec des caractéristiques distinctes telles que la présence d'un manteau hérissé autour de ces structures (Roth and Porter, 1964). De telles vésicules ont aussi été associées au bourgeonnement de la membrane à la surface présynaptique dans les terminaisons nerveuses (synapses) (Gray and Willis, 1970) ou encore à l'endothélium des capillaires sanguins (Palade and Bruns, 1968).



*Figure 8 | Première observation d'une vésicule d'endocytose par Roth et Porter. Image de microscopie électronique montrant une couche uniforme de matériel dense (DM) à l'intérieur de la vésicule en formation (U), tandis que le côté cytoplasmique de la vésicule présente un manteau protéique (tête de flèche).*

*Source : Adaptée de Roth and Porter, 1964*

En 1969, la structure en « panier de basket » sphérique du manteau protéique de la vésicule est observée (Figure 9), avec une organisation en pentagones et hexagones (Kanaseki and Kadota, 1969). Puis en 1975, suite à une analyse biochimique, la protéine principale composant ce manteau icosaèdre conférant la taille et la forme de la vésicule lipidique, sera découverte par Pearse et nommée clathrine. Bien que les vésicules recouvertes de clathrine puissent également être formées à partir d'autres compartiments membranaires tel que l'appareil de Golgi, le terme endocytose dépendante de la clathrine (EDC) est utilisé pour désigner uniquement l'entrée de protéines cargos de la membrane plasmique ou de la matrice extracellulaire à l'intérieur de la cellule grâce à la formation de vésicules formées à partir de la membrane plasmique (McMahon and Boucrot, 2011).

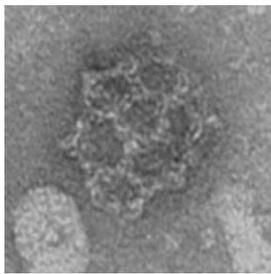


Figure 9 | Structure en « panier de basket » de la clathrine.

Source : Adaptée de Kanaseki and Kadota, 1969

## 2.2. Les différentes étapes de la formation des vésicules d'endocytose

Comme décrit précédemment, ce manteau est visible au microscope électronique et les stades intermédiaires de formation des vésicules ont été documentés (Figure 10). La formation de vésicules recouvertes de clathrine passe par 5 étapes distinctes qui ont été observées lors d'études morphologique membranaire et cellulaire : initiation, invagination membranaire, assemblage du manteau de clathrine, scission/fission et désassemblage du manteau de clathrine. Cette succession d'étapes est coordonnée grâce à un réseau flexible d'interactions, qui peut être considéré comme composé de différents modules. Ce réseau d'interaction protéiques est ainsi responsable de la progression à travers les différentes étapes pour la formation des vésicules (Figure 11).

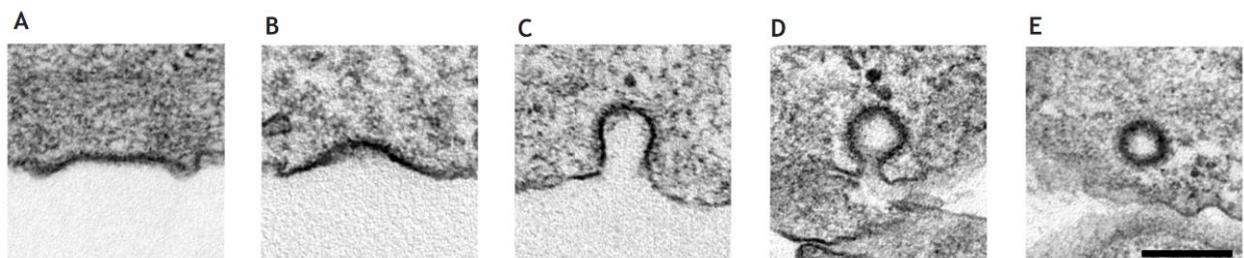


Figure 10 | Etapes de la formation d'une vésicule d'endocytose au cours du temps.

Images de microscopie électronique illustrant les différents stades de formation d'une vésicule d'endocytose. La membrane plasmique pratiquement plate recouverte de clathrine (A), s'invagine pour former un puits recouvert de clathrine (B). Ce puits s'invagine plus profondément jusqu'à former un bourgeon vésiculaire (C). Puis ce bourgeon se transforme en vésicule et voit son cou rétrécir (D) pour former une vésicule recouverte de clathrine complètement libre dans le cytoplasme (E). Barre d'échelle = 200 nm.

Source : Haucke and Kozlov, 2018

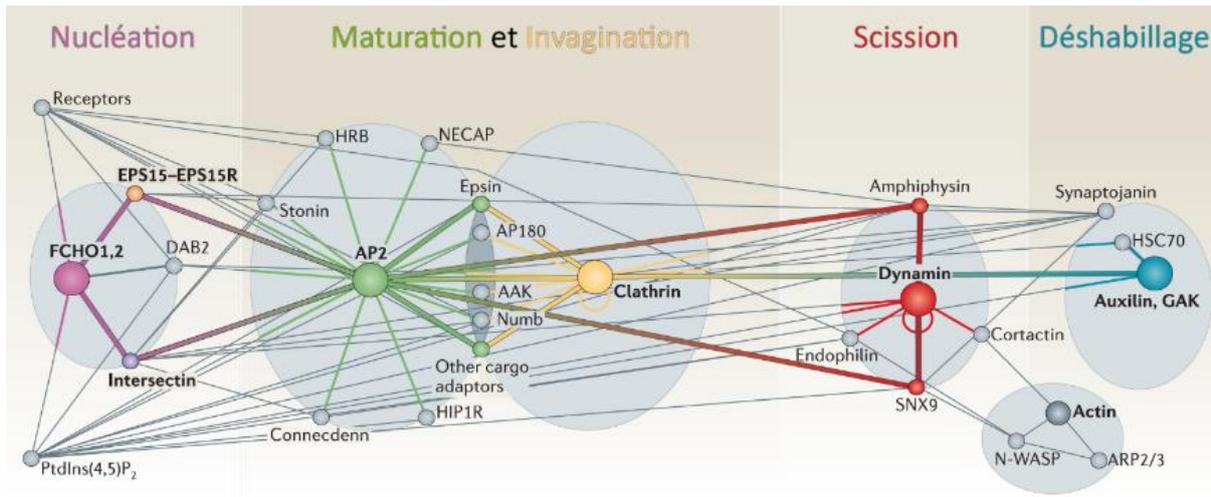


Figure 11 | Modules des interactions de l'endocytose dépendante de la clathrine.

Chaque point de couleur représente l'acteur principal d'un module donné. Les lignes épaisses de couleur représentent les interactions permettant la progression d'une étape à l'autre. Les lignes grises représentent quelques-unes des interactions connues entre les différentes protéines. L'AP-2 et la clathrine apparaissent comme les acteurs majeurs en raison de leur myriade de partenaires d'interaction. Fait important, bien que la plupart des protéines lient les cargos ou le PIP<sub>2</sub>, la clathrine ne se lie pas directement à ces derniers.

Source : Adaptée de McMahon and Boucrot, 2011

Plus précisément, le processus est amorcé lorsque des protéines adaptatrices commencent à se regrouper sur le feuillet interne de la membrane plasmique, entraînant le recrutement de la clathrine qui permettra la stabilisation de cet agrégat. L'assemblage de ce manteau protéique se poursuit ensuite par le recrutement d'autres protéines à partir du réservoir cytosolique. Certaines protéines ont la capacité d'induire la courbure de la membrane plasmique, ce qui transforme localement la membrane plasmique en un PRC. Le processus de scission rétrécit et coupe le cou de l'invagination membranaire pour séparer la vésicule recouverte de clathrine de la membrane plasmique. La polymérisation de l'actine coopère avec le manteau et les protéines de scission pour favoriser la mise en forme des membranes. Enfin, la vésicule est libérée de son manteau protéique par des protéines de déshabillage/désassemblage du manteau, permettant à celle-ci de faire l'objet d'un trafic ultérieur à l'intérieur de la cellule (Figure 12).

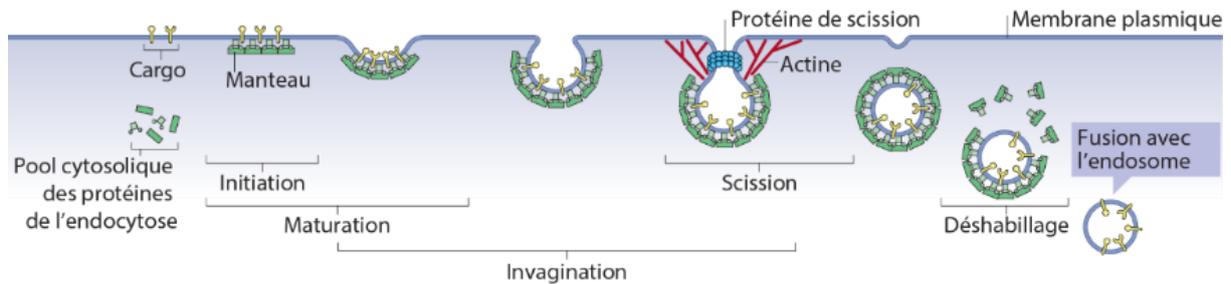


Figure 12 | Les 5 étapes de la formation d'une vésicule d'endocytose.

Les modules protéiques permettant l'endocytose sont assemblés séquentiellement à partir d'un pool cytosolique de protéines solubles. Après l'initiation, le cargo à internaliser est recruté, puis la membrane plasmique est invaginée pour former une vésicule qui est ensuite séparée de la membrane plasmique par scission. Le déshabillage libère les protéines de l'endocytose ainsi que la vésicule qui participera au trafic intracellulaire.

Source : Adaptée de Kaksonen and Roux, 2018

### 2.2.1. Initiation : la nucléation

La première étape de l'endocytose est le regroupement de plusieurs protéines au niveau de la membrane plasmique, formant un **noyau** pour l'assemblage du manteau vésiculaire de clathrine. L'initiation définit le site de formation de la vésicule d'endocytose et constitue probablement l'étape clé de la régulation de la fréquence des événements d'endocytose (Henne et al., 2010; Nunez et al., 2011). Néanmoins, il arrive que la formation des vésicules soit avortée à des stades plus tardifs pendant le processus de formation de la vésicule (Ehrlich et al., 2004; Loerke et al., 2009). Les sites de formation vésiculaire à la membrane plasmique sont décrits comme aléatoires dans certaines conditions, nécessitant juste la collision stochastique des protéines AP-2 (Encadré 1) à la membrane plasmique pour amorcer ensuite l'assemblage du manteau de clathrine (Cocucci et al., 2012; Ehrlich et al., 2004). Cependant, dans certains cas, la formation de vésicules d'endocytose peut se produire de façon répétée à certains endroits de la membrane plasmique (Merrifield et al., 2005; Nunez et al., 2011) ou être concentrée/cantonée à certaines régions de la cellule comme c'est le cas au niveau des synapses pour les neurones (Blanpied et al., 2002) ou des sites d'adhérence le long des fibres de collagène (Elkhatib et al., 2017). Cette formation non aléatoire de vésicules à certains endroits de la membrane plasmique suggère l'existence de domaines membranaires pouvant regrouper/concentrer des lipides ou protéines d'endocytose localement. Morphologiquement, l'initiation de la formation d'une vésicule commence par la formation d'une invagination de la membrane appelée « puits ». Au niveau moléculaire, cette initiation nécessite le recrutement coordonné de protéines pionnières qui sont l'AP-2, la clathrine, FCHO1/2, l'EPS15, l'epsin et CALM/AP180 (Kaksonen and Roux, 2018), tout en les regroupant dans des zones de la membrane plasmique riche en PI(4,5)P<sub>2</sub> (Antonescu et al., 2011; Zoncu et al., 2007). Le PI(4,5)P<sub>2</sub> est le phosphoinositide le plus important pour l'endocytose, car de nombreuses protéines endocytaires, comme AP-2 et la dynamine, s'y lient spécifiquement. AP-2

interagit à la fois avec le PI(4,5)P<sub>2</sub> présent à la membrane plasmique mais reconnaît aussi les motifs de séquence d'internalisation des cargos à endocyter (Tableau 1) (Kirchhausen et al., 1997; Traub and Bonifacino, 2013), permettant ainsi de relier les cargos à la couche de clathrine sous-jacente (Cocucci et al., 2012; Collins et al., 2002; Kelly et al., 2008; Taylor et al., 2011; Umasankar et al., 2012). Le rôle des cargos pour l'initiation est encore débattu à ce jour, à savoir si leur forte concentration locale accompagne ou participe au déclenchement de la formation de la vésicule (Henry et al., 2012; Lampe et al., 2014a; Puthenveedu and von Zastrow, 2006).

Motifs d'internalisation	Sous-unités ou domaines d'AP-2
YXXØ	µ2
[DE]XXXL[L]	α-σ2
[YF]XNPX[YF]	α ?

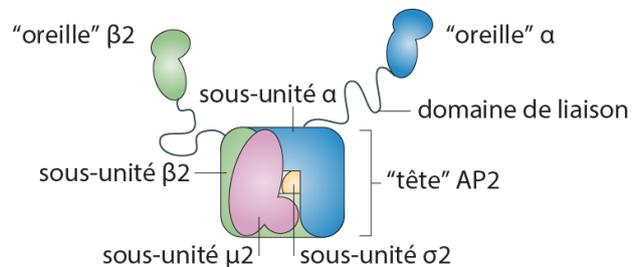
Tableau 1 | Séquences d'internalisation reconnues par AP-2.

Dans cette notation, les acides aminés sont représentés par un code à une lettre, X indique tout acide aminé, Ø indique un acide aminé avec une chaîne latérale hydrophobe volumineuse, et les crochets signifient que l'un ou l'autre acide aminé est autorisé dans cette position.

### Encadré 1 | La protéine adaptatrice 2

AP-2 interagit spécifiquement avec le PI(4,5)P<sub>2</sub> et permet ainsi à la clathrine de se localiser à la membrane plasmique. AP-2 est un complexe stable constitué de 4 sous-unités dont 2 larges sous-unités α-adaptine et β2-adaptine, une moyenne sous-unité µ2 et une petite sous-unité σ2. Les deux larges sous-unités α- et β2-adaptine composent la « tête » et sont chacune reliées à un domaine C-terminal appelé « oreille » via un domaine de liaison (Traub, 2009). Ces « oreilles » positionnées à l'extrémité de longs liens flexibles, sont parfaitement conçues pour le recrutement de protéines depuis le cytosol jusqu'au puits d'endocytose. Chaque « oreille » présente deux sous-domaines ayant différentes affinités pour environ 20 protéines de tri associées à la clathrine (CLASPs pour clathrin-associated sorting proteins) (Traub and Bonifacino, 2013). L'EPS15 et l'intersectine peuvent lier l'une ou l'autre des deux oreilles tandis que d'autres protéines sont spécifiques d'une oreille. Par exemple la dynamine 2 se lie uniquement à l'oreille α, tandis que la β-arrestine est spécifique de l'oreille β2 (Schmid et al., 2006). La phosphorylation de µ2 permet d'augmenter la liaison au PI(4,5)P<sub>2</sub> et aux cargos grâce à un changement conformationnel du complexe AP-2 (Owen, 2000). Chaque sous-unité est impliquée dans des interactions protéines-protéines différentes : la « tête » de la sous-unité β2-adaptine ainsi que les « oreilles » des sous-unités α- et β2-adaptines interagissent avec la clathrine (ter Haar et al., 2000 ; Owen, 2000) ; la sous-unité α-adaptine de la tête lie le PI(4,5)P<sub>2</sub> et le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> ; l'hémi-complexe α/σ2 et la sous-unité µ2 interagissent avec différents motifs d'internalisation présents sur les cargos à internaliser.

Source image : Adaptée de Traub, 2009



AP-2 interagit également avec un grand nombre de protéines essentielles pour la naissance de la future vésicule telles que les protéines à domaine F-BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) FCHO1/2 (Fer/Cip4 homology domain-only), les protéines d'échafaudage EPS15 et les intersectines 1/2 ainsi que les protéines adaptatrices de cargo (CLASPs) (Figure 13). FCHO est considéré comme le nucléateur des PRC car son recrutement et sa localisation aux PRC précède celui d'AP-2 et de la clathrine (Henne et al., 2010). Sa surexpression ou son inhibition modifie le taux de nucléation des PRC, déterminé par le nombre de nouveaux PRC par unité de surface par seconde (Henne et al., 2010). Lorsque les niveaux des protéines FCHO sont diminués par ARN interférents, le nombre de puits de clathrine à la membrane plasmique chute de manière drastique et entraîne une inhibition de l'internalisation de la transferrine (qui transporte le fer dans les cellules), du cholestérol (LDL) et du facteur de croissance EGF (epidermal growth factor). À l'inverse, la surexpression de FCHO induit une augmentation du nombre de puits et de vésicules de clathrine (Henne et al., 2007, 2010). De plus, les protéines FCHO possèdent un domaine F-BAR (Encadré 2) qui reconnaît et pourrait contribuer à la courbure de la membrane pour l'initiation du puits (Henne et al., 2007). Les protéines FCHO pourraient définir ainsi l'endroit où les puits de clathrine se formeront. De façon importante, l'ensemble de ces protéines pionnières permettent ainsi le recrutement et l'élargissement du manteau de clathrine autour du bourgeon vésiculaire naissant.

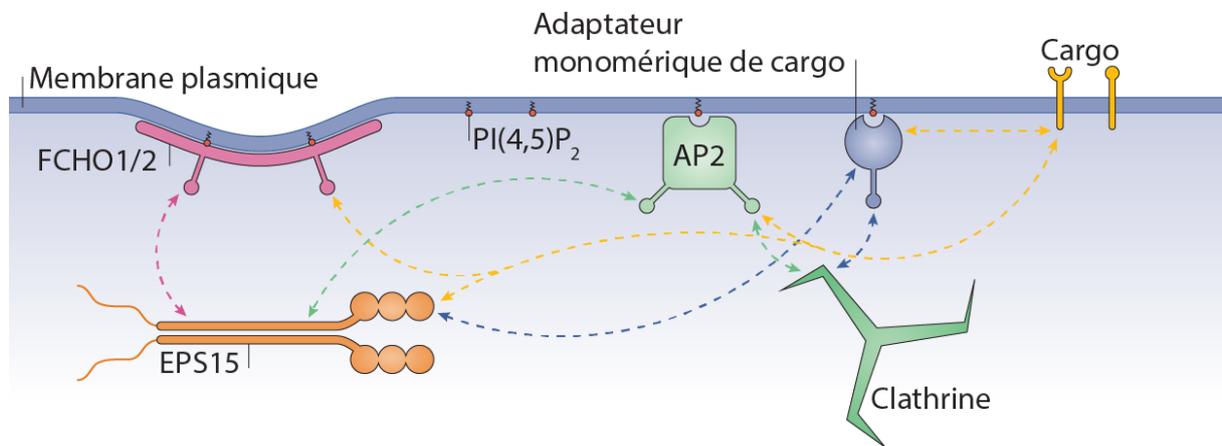


Figure 13 | Initiation du bourgeonnement membranaire.

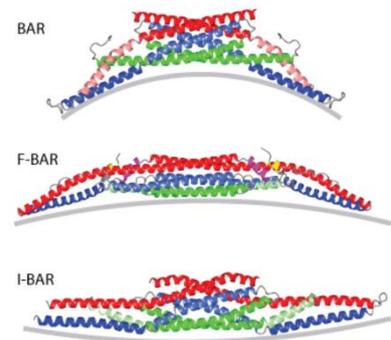
Les protéines pionnières sont : le complexe FCHO1/2, l'AP-2, l'EPS15 et les adaptateurs monomériques de cargo (CLASPs) qui permettent le recrutement de la clathrine.

Source : Adaptée de Kaksonen and Roux, 2018

**Encadré 2 | Les protéines à domaine BAR**

Les protéines BARs (pour Bin/Amphiphysin/Rvs) sont des protéines qui se lient aux membranes grâce à des liaisons électrostatiques. Elles peuvent être divisées en trois catégories en fonction de leur homologie de séquence : Les BAR, les F-BAR (Fer/Cip4 homology-BAR) et les I-BAR (pour IRSp53-BAR). Les BAR et F-BAR se lient aux membranes concaves et sont ainsi associées aux invaginations membranaires lors du trafic vésiculaire et de l'endocytose, tandis que les I-BAR lient les membranes convexes. De nos jours il est admis que ces protéines sont à la fois des senseurs de déformations membranaires et acteurs de ces mêmes déformations. Cette double fonction semble reliée à leurs concentrations : à basse concentration, elles auraient un rôle de senseur ; à haute concentration, elles pourraient induire la déformation des membranes. Une autre caractéristique importante est que la plupart de ces protéines possèdent un domaine SH3 (Src Homology 3) qui leur permettent de lier les domaines PRD (pour prolin-rich domain) d'autres protéines comme la dynamine (Frost et al., 2008; Henne et al., 2007; Peter et al., 2004).

Source image : Adaptée de « [endocytosis.org](http://endocytosis.org) »

**2.2.1.1. Maturation : sélection des cargos et formation du manteau de clathrine**

La prochaine étape de la formation d'une vésicule est la sélection des cargos à incorporer dans la vésicule, et la formation du manteau de clathrine autour de la membrane. Des protéines accessoires permettent la sélection du cargo à endocyter. D'autres organisent le processus d'assemblage du manteau de clathrine mais également le processus de bourgeonnement de la membrane en une vésicule.

**2.2.1.2. Sélection des cargos**

Après la clathrine, l'AP-2 (Encadré 1) est le composant le plus abondant des vésicules recouvertes de clathrine (Blondeau et al., 2004). L'AP-2 sert de médiateur principal pour la sélection des cargos à endocyter, il interagit directement avec les motifs cytoplasmiques d'internalisation des récepteurs transmembranaires via sa sous-unité  $\mu$  et sa sous-unité  $\sigma$ , et indirectement via ses domaines « oreilles » pour lier les protéines adaptatrices monomériques accessoires (CLASP) directement liées aux cargos. Par exemple, les récepteurs à la transferrine (TfR) et au lipoprotéine de faible densité (LDLR pour low density lipoprotein receptor) sont constitutivement internalisés de deux façons différentes. Le TfR possède un motif « tyrosine » YXX $\phi$  dans sa région C-terminale qui interagit directement avec la sous-unité  $\mu_2$  d'AP-2. Le LDLR, en revanche, nécessite une liaison à un adaptateur tel que ARH ou Dab2, contenant un domaine de liaison phosphotyrosine (PTB), qui à son tour interagira avec la clathrine et/ou l'oreille  $\beta_2$  d'AP-2. Par conséquent, le TfR et le LDLR ne se font pas concurrence pour l'internalisation (Traub, 2009; Traub and Bonifacino, 2013). Il est important de noter que, contrairement à l'internalisation constitutive du TfR et du LDLR, certains récepteurs ont besoin d'être

activés, notamment en liant leurs ligands, afin de pouvoir être endocytés. Ceci permet à la cellule de contrôler dans le temps, quelle cargaison doit être internalisée. C'est notamment le cas des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) comme le récepteur  $\beta$ 2-adrénérgique ( $\beta$ 2AR), mais aussi de certains canaux ioniques comme les récepteurs AMPA (AMPA) glutamatergiques neuronaux.

### 2.2.1.3. Formation du manteau de clathrine

En plus de se lier aux cargos, AP-2 et les protéines adaptatrices accessoires des cargos interagissent aussi directement avec les lipides (PI(4,5)P<sub>2</sub>) et la clathrine, formant ainsi un réseau complexe d'interactions qui peuvent médier l'initiation et la maturation de l'assemblage du manteau de clathrine ainsi que son expansion ultérieure de manière très complexe et coopérative. La liaison d'AP-2 au PI(4,5)P<sub>2</sub> et aux cargos est associée à un changement de conformation important dans AP-2, qui révèle le site de liaison pour la clathrine et lui permet ainsi de recruter la clathrine pour l'assemblage du manteau (Jackson et al., 2010; Kadlecova et al., 2017; Kelly et al., 2014; Owen, 2000). En particulier, les cargos avec des motifs de reconnaissance type « tyrosine » YXXØ tels que le récepteur de transferrine peuvent activer le complexe AP-2 de cette façon et favoriser l'assemblage du manteau de clathrine (Höning et al., 2005). Les protéines adaptatrices spécifiques des cargos lient toujours l'adaptateur central AP-2. Comme AP-2 se lie à la clathrine et à la plupart des protéines accessoires, il agit comme l'élément majeur des interactions pour la maturation et l'assemblage du manteau de clathrine aux puits d'endocytose à la membrane plasmique (Motley et al., 2003). En effet l'inhibition de l'expression d'AP-2 par ARN interférent empêche le recrutement de la clathrine à la membrane plasmique et donc la formation vésiculaire, mais cela n'empêche pas l'assemblage du complexe de nucléation des protéines FCHO par exemple. Ceci prouve le rôle crucial d'AP-2 dans la formation des vésicules recouvertes de clathrine. Ainsi, l'assemblage de la couche de clathrine se fait en continu avec le recrutement des protéines initiatrices et d'AP-2 (Boucrot et al., 2010). Plusieurs études ont suggéré qu'il existe un mécanisme, « point de contrôle de la cargaison », qui couple les processus de chargement des cargos et le bourgeonnement des vésicules. Si le nombre de molécules cargos recrutées ne dépasse pas un certain seuil, le mécanisme du « point de contrôle de la cargaison » pourrait soit interrompre le site endocyttaire, ce qui entraîne le désassemblage du revêtement ou retarde l'achèvement du bourgeonnement des vésicules. Ce mécanisme garantit ainsi que les vésicules qui se forment, sont remplies de molécules à endocyter (Carroll et al., 2012; Ehrlich et al., 2004; Loerke et al., 2009; Mettlen et al., 2009, 2010).

## 2.2.2. Invagination : les effecteurs de la courbure membranaire

### 2.2.2.1. La clathrine

La première fonction proposée pour la clathrine (Encadré 3) était la flexion des membranes. L'assemblage de cette protéine en « panier de basket » icosaèdre a suggéré que sa polymérisation pouvait induire une courbure et par conséquent imposer la forme sphérique finale de la membrane plasmique à l'intérieur de cette cage de clathrine (Kirchhausen and Harrison, 1981; Pearse, 1975). Deux modèles opposés sur la façon dont la clathrine pourrait servir d'échafaudage à la membrane ont été proposés et sont encore débattus aujourd'hui (Figure 14). Le premier modèle propose que la clathrine polymériserait d'abord à plat, puis par une réorganisation progressive de son maillage, tout en gardant sa surface constante, se courberait en une couche sphérique, forçant la membrane à bourgeonner. Cette première hypothèse vient d'observations de structures de la clathrine à la membrane plasmique en microscopie électronique avec des mailles de clathrine de courbure variable, allant des bourgeons plats aux bourgeons fortement incurvés (Heuser, 1980). Le deuxième modèle propose que la clathrine se polymérise directement sur la membrane sous la forme d'un maillage courbe. Le premier modèle a été validé par des études récentes combinant microscopie de fluorescence et microscopie électronique à transmission (Avinoam et al., 2015) ou microscopie électronique sur la face cytoplasmique (Bucher et al., 2018). De plus, des expériences de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) montrent que le taux de renouvellement élevé du maillage de clathrine *in vivo* (Avinoam et al., 2015; Loerke et al., 2005; Wu et al., 2001). Cette étude suggère ainsi que, *in vivo*, le maillage de clathrine est rapidement réorganisé, donnant une souplesse nécessaire au maillage de clathrine pour s'adapter aux changements de courbure de la membrane associés au bourgeonnement.

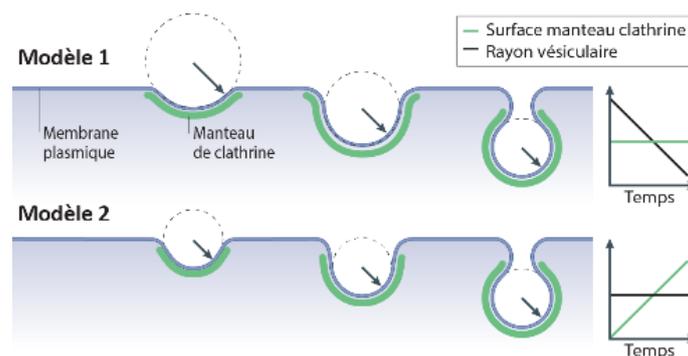


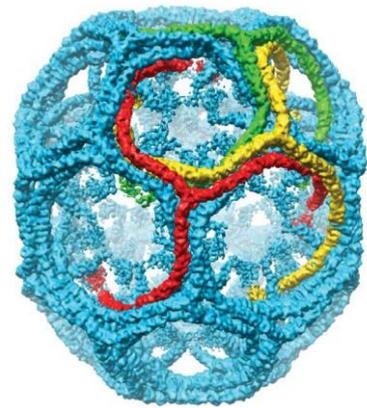
Figure 14 | Modèles d'assemblage du manteau de clathrine.

**Modèle 1** : La couche de clathrine s'assemble d'abord en une couche plate et sans modifier sa surface, le maillage de clathrine est ensuite remodelé pour augmenter la courbure. Ainsi la surface du manteau (en vert sur le graphique) reste inchangée mais le rayon vésiculaire diminue (en noir sur le graphique). **Modèle 2** : La couche de clathrine s'assemble directement en un bourgeon à courbure constante. La surface du manteau de clathrine (en vert sur le graphique) augmente avec le temps à partir d'un puits peu profond, pour finalement atteindre la forme sphérique complète et le rayon vésiculaire reste inchangé (en noir sur le graphique).

Source : Adaptée de Kaksonen and Roux, 2018

### Encadré 3 | La clathrine

En 1975, Barbara Pearse a purifié le principal composant protéique des vésicules et l'a nommé clathrine (Pearse, 1975). La clathrine est composée de deux sous-unités : une chaîne légère de clathrine (Clc) et une chaîne lourde de clathrine. Au bout de chaque chaîne lourde se trouve un domaine d'hélice  $\beta$  appelé domaine terminal (TD) qui est responsable du rôle de la clathrine en tant que protéine plateforme « hub » (ter Haar et al., 2000). Trois chaînes lourdes et trois chaînes légères peuvent s'assembler pour prendre la forme d'un triskelion (de couleur rouge, jaune ou verte sur l'image) (Loerke et al., 2005). Environ 100 triskelia peuvent s'oligomériser les uns avec les autres pour former spontanément des cages composées de facettes pentagonales et hexagonales créant un échafaudage autour de la vésicule (Image ci-contre). Cependant, la clathrine ne lie pas directement les membranes et nécessite donc que les adaptateurs soient correctement localisés.



Source image : Fotin et al., 2004

Bien que la clathrine participe à la courbure membranaire, il a été démontré que les protéines adaptatrices de la clathrine se liant aux membranes participent également à la déformation de la membrane plasmique. La transition entre structure plane et courbe est fortement régulée par la tension membranaire et pourrait faire intervenir des protéines comme CALM (Scott et al., 2018). Ainsi les membranes peuvent être pliées par des forces agissant dans la membrane plasmique ou sur la membrane plasmique.

#### 2.2.2.2. Les protéines à domaines ENTH et ANTH

Les insertions peu profondes à l'intérieur de la membrane peuvent fonctionner comme des coins et entraîner une courbure de la membrane (Figure 15). Pour qu'un « coin » fonctionne efficacement, l'insertion doit occuper un grand volume à la surface de la membrane. Une hélice amphipathique, telle que celle du domaine d'homologie N-terminale (ENTH) des protéines epsine recrutée pour l'initiation de la formation des PRC, s'insère dans la membrane et provoque une inclinaison et l'évasement des lipides entraînant ainsi une courbure positive vers l'intérieur cellulaire (Ford et al., 2001; McMahon and Gallop, 2005). Il en est de même pour le domaine d'homologie AP180 N-terminal (ANTH) des protéines CALM, qui favorise la courbure de la membrane à un stade précoce de la formation vésiculaire (Ford et al., 2002; Miller et al., 2015; Saleem et al., 2015; Scott et al., 2018).

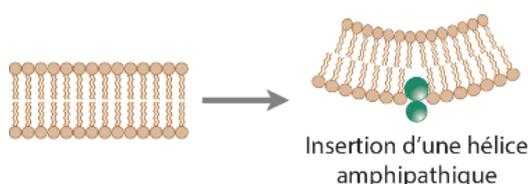


Figure 15 | Courbure de la membrane.

La membrane se courbe suite à l'insertion d'une hélice amphipathique dans l'un des feuillet de la bicouche.

Source : Adaptée de McMahon and Gallop, 2005

### 2.2.2.3. Les protéines à domaine BAR

Les protéines possédant des domaines BAR (Encadré 2) aident également à l'induction et à la stabilisation des invaginations membranaires *in vivo* (Ringstad et al., 1999; Takei et al., 1999). Ces domaines ont en effet une structure en forme de croissant qui résulte de l'interaction entre deux monomères protéiques. Il a été démontré que la forme en croissant de ces protéines détecte et/ou induit la courbure de la membrane à un degré correspondant au diamètre du croissant formé par ces dimères. Ainsi les protéines présentant des domaines F-BAR peu incurvés seraient recrutées en premières autour du bourgeon vésiculaire, et les protéines possédant un domaine BAR plus courbé seraient recrutées plus tard dans la formation de la vésicule notamment au niveau du cou vésiculaire (Frost et al., 2008; Henne et al., 2007; Peter et al., 2004). Par exemple, les protéines nucléatrices FCHO1/2 possèdent un domaine F-BAR ayant une courbure faible, correspondant au stade précoce de formation d'une vésicule (Henne et al., 2010). Les protéines à domaines BAR et N-BAR, qui possèdent de plus fortes courbures, comme l'endophiline et l'amphiphysine, sont recrutées au niveau du cou des vésicules pour promouvoir une courbure plus importante en formant un polymère et participent également au recrutement de la dynamine. De plus ces protéines à domaines BAR possèdent d'autres domaines de liaisons aux lipides (PH/PX) ou à la clathrine (Ramjaun and Mcpherson, 1998) qui peuvent aider à leur recrutement. Notamment l'amphiphysine possède un domaine de liaison à AP-2 (Praefcke et al., 2004) et à la clathrine (Ramjaun and Mcpherson, 1998) mais également un domaine de liaison SH3 pour les protéines contenant un domaine PRD comme la dynamine. Ainsi la localisation de l'amphiphysine au niveau du cou vésiculaire au stade tardif de la formation des vésicules est en cohérence avec son interaction avec la dynamine qui permet à terme d'effectuer la scission du cou membranaire pour libérer la vésicule nouvellement formée dans le cytoplasme. Ainsi ces protéines aideraient au processus de formation d'une vésicule (Meinecke et al., 2013).

### 2.2.2.4. L'actine

En plus de la couche de clathrine et des protéines adaptatrices, le cytosquelette d'actine peut contribuer à la flexion de la membrane pendant la formation des vésicules recouvertes de clathrine. Les premières preuves d'un rôle de l'actine dans l'endocytose proviennent d'études qui ont montré une inhibition de l'endocytose lorsque le cytosquelette d'actine est perturbé par des inhibiteurs ou des mutations des facteurs impliqués dans la dynamique de l'actine (Ayscough et al., 1997; Boulant et al., 2011; Fujimoto et al., 2000; Gottlieb et al., 1993; Lamaze et al., 1997; Salisbury et al., 1980). La polymérisation de l'actine est associée aux phases plus tardives de l'endocytose lorsque la membrane présente une invagination importante car son inhibition bloque le processus de formation d'une vésicule lorsque la membrane plasmique a déjà formé une invagination en forme de U (Ferguson et

al., 2009; Grassart et al., 2014; Li and Betzig, 2015; Merrifield et al., 2002, 2005; Taylor et al., 2011). La polymérisation des filaments d'actine est probablement le principal mécanisme par lequel la force nécessaire pour plier la membrane endocytaire est produite (Figure 16). La polymérisation localisée au niveau de la membrane plasmique générerait un flux de filaments d'actine partant de la base de l'invagination et dirigé vers l'intérieur cellulaire aidant ainsi à la formation de la future vésicule (Collins et al., 2011; Picco et al., 2015). Un couplage entre les filaments d'actine et la couche de clathrine transmettrait la force nécessaire pour plier la membrane. Après scission vésiculaire, les filaments d'actine se dépolymérisent en quelques secondes.

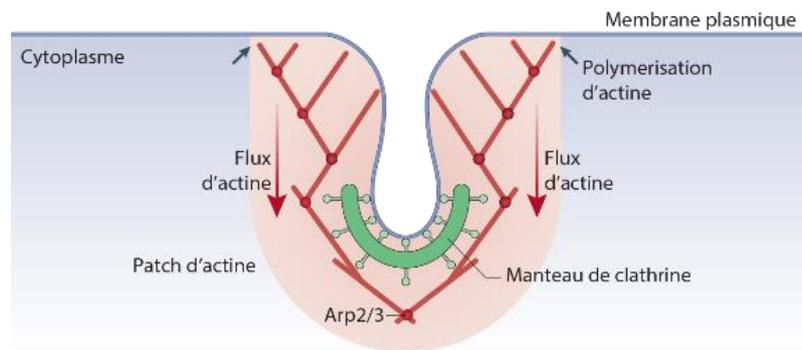


Figure 16 | Modèle d'invagination membranaire par polymérisation d'actine dans la levure.

Les filaments d'actine polymérisent depuis la base de l'invagination membranaire. La polymérisation continue pousse le réseau d'actine dans la cellule (flux d'actine). Le manteau de clathrine couplé à ce réseau de filaments d'actine est ainsi poussé vers l'intérieur de la cellule en parallèle du flux d'actine.

Source : Adaptée de Kaksonen and Roux 2018

### 2.2.3. Scission/Fission : naissance des vésicules

La scission est l'étape au cours de laquelle la vésicule qui se forme est séparée de la membrane plasmique pour être libérée dans le cytosol. Dans l'EDC, cette étape est catalysée par la grande dynamine GTPase, qui s'assemble en un collier hélicoïdal au cou de la vésicule, qui se resserre et coupe via l'hydrolyse de GTP. L'inhibition de la dynamine mène à l'arrêt de l'endocytose démontrant ainsi son rôle clé pour la scission vésiculaire (Ferguson et al., 2009). La description et les caractéristiques mécanistiques/mécaniques de cette protéine dans l'EDC sont minutieusement décrites dans le prochain chapitre (« La dynamine » p 70). Bien que la dynamine seule puisse rétrécir et couper les tubules lipidiques, la constriction du cou vésiculaire *in vivo* est susceptible d'être assistée et régulée par d'autres facteurs pour atteindre la scission. Il s'agit notamment de la tension membranaire exercée par l'actine lors de sa polymérisation (Boulant et al., 2011) ; de la distribution hétérogène des lipides notamment du PI(4,5)P<sub>2</sub> qui se retrouve plus concentré au niveau du cou membranaire que dans le bourgeon vésiculaire, contribuant ainsi à la tension membranaire (Liu et al., 2009) ; et de la

déformation partielle de la membrane par les protéines à domaine BAR (Frost et al., 2008; Henne et al., 2007; Peter et al., 2004). Une étude faite sur des fibroblastes n'exprimant plus les dynamines 1 et 2 (double knock out) a montré l'arrêt de la formation des vésicules à un stade où les puits recouverts de clathrine sont profondément invaginés et présentent des cous très allongés recouverts de protéines à domaine BAR comme l'endophiline 2 (Figure 17) (Ferguson et al., 2009). Cette étude démontre également l'importance de l'actine pour l'élongation des cous vésiculaires car sa dépolymérisation (par utilisation de latrunculline B) mène à l'effondrement des puits recouverts de clathrine à/en des invaginations en forme de  $\Omega$  avec des cous larges et courts (Figure 17). Ceci indique aussi un rôle de la F-actine pour le recrutement des protéines à domaine BAR au niveau du cou des puits recouverts de clathrine.

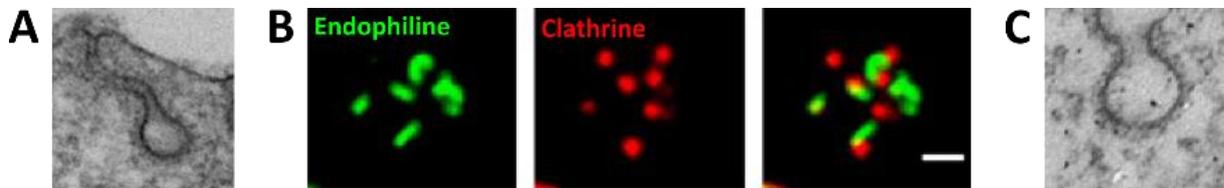


Figure 17 | Allongement des cous vésiculaires suite à la suppression de l'expression de la dynamine.

**(A)** Image de microscopie électronique montrant l'élongation du cou des vésicules recouvertes de clathrine suite à la suppression de l'expression de la dynamine. **(B)** Image de microscopie confocale montrant que le cou des vésicules est recouvert par l'endophiline (en vert) et qu'au bout de ce cou, se trouve la vésicule recouverte du manteau de clathrine (en rouge). Barre d'échelle, 1  $\mu$ m. **(C)** Image de microscopie électronique montrant un puits recouvert de clathrine n'ayant plus un cou allongé et étroit, mais court et large suite au traitement à la latrunculline B (inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine) dans les cellules n'exprimant plus la dynamine.

Source : Adaptée de Ferguson et al., 2009

De plus le recrutement de la dynamine au cou des vésicules est une étape importante. La dynamine interagit avec de nombreux partenaires à travers son domaine c-terminal riche en proline (PRD), parmi lesquels les protéines BAR sont particulièrement importantes. En effet les protéines BAR comme l'endophiline et l'amphiphysine possèdent des domaines SH3 qui lient le domaine PRD de la dynamine. Ainsi ces protéines à domaines BAR, liées au niveau de la courbure membranaire du cou des bourgeons vésiculaires, permettent de recruter la dynamine. Il est important de noter que l'amphiphysine est nécessaire pour la scission membranaire (Meinecke et al., 2013). Toutefois, la contribution exacte des protéines à domaine BAR pour la scission du cou vésiculaire n'est pas très claire, certaines études ayant montré une amélioration et d'autres une inhibition de la fission de la dynamine par les protéines BAR (Farsad et al., 2001; Hohendahl et al., 2017; Meinecke et al., 2013; Neumann and Schmid, 2013; Yoshida et al., 2004).

#### 2.2.4. Déshabillage/désassemblage du manteau de la vésicule

Une fois la vésicule formée et détachée de la membrane plasmique, le manteau de clathrine est désassemblé et chaque triskèle de clathrine est libéré grâce au recrutement d'une ATPase, la protéine de choc thermique 70 (HSCP70 pour heat shock cognate 70) par son co-facteur l'auxiline (ou cycline G-associated kinase (GAK) dans les tissus non neuronaux) (Schlossman et al., 1984; Ungewickell et al., 1995). Le déshabillage est nécessaire pour permettre à la vésicule formée d'être transportée et de fusionner avec son endosome cible. L'auxiline est recrutée après le bourgeonnement des vésicules recouvertes de clathrine (Scheele et al., 2001; Taylor et al., 2011) en se liant aux domaines terminaux et aux chevilles des triskèles de clathrine (Fotin et al., 2004). Là, l'auxiline recrute HSC70 et la réaction de désassemblage est initiée (Rapoport et al., 2008; Xing et al., 2010). Il faut une molécule d'auxiline et trois molécules de HSC70 ou moins par triskèle pour obtenir un désassemblage maximal *in vitro* (Böcking et al., 2011; Rothnie et al., 2011). Il est important de se rappeler que, lorsqu'il y a scission des vésicules recouvertes de clathrine, il est peu probable que la cage de clathrine soit complétée dans la zone où le cou était attaché, laissant ainsi un défaut dans la cage de clathrine qui permet à l'appareil de désassemblage de commencer facilement le procédé. Il est suggéré dans la littérature, que ce défaut apparent, est la raison pour laquelle le désassemblage n'a lieu qu'après la scission des vésicules. Des changements dans la composition en phosphoinositides par la phosphatase synaptojanine sont nécessaires pour le désassemblage (Cremona et al., 1999), mais à ce jour il n'a pas encore été montré si la synaptojanine agit en facilitant le recrutement des auxilines (Massol et al., 2006). Le désassemblage libère ainsi les triskèles de clathrine dans le cytoplasme les rendant disponible pour être recrutés et réutilisés pour la formation de nouvelles vésicules de clathrine.

### 2.3. Rôles fonctionnels de l'endocytose dépendante de la clathrine

Les descriptions faites dans les paragraphes suivants se veulent une vue d'ensemble, et la liste des rôles fonctionnels, probablement non exhaustive, brièvement présentée ici s'inspire notamment de deux études (McMahon and Boucrot, 2011) et (Gould and Lippincott-schwartz, 2009). La plupart des exemples cités ici sont tirés de l'endocytose des mammifères, même si de nombreux travaux effectués sur des levures ou autres organismes modèles pourraient illustrer les mêmes concepts.

#### 2.3.1. Endocytose et absorption des nutriments

L'endocytose se réfère principalement à l'absorption en phase liquide. Le liquide extracellulaire contient de nombreux nutriments, tels que les acides aminés, l'ATP (pour adénosine triphosphate), les facteurs de croissance et l'oxygène, ainsi que des métabolites, tels que le cholestérol et le fer, importants pour la fonction cellulaire. On sait que l'appauvrissement en nutriments induit l'autophagie

via la phagocytose, c'est-à-dire la mort cellulaire régulée (Russell et al., 2014). L'EDC des récepteurs impliqués dans la détection de ces facteurs peut se produire de deux façons différentes : de façon constitutive ou par stimulation. Le TfR, par exemple, est constitutivement endocyté, ce qui signifie qu'il n'a pas besoin d'être lié à son ligand, la transferrine (Tfn, une protéine de liaison du fer) pour être internalisé. D'autre part, l'EGFR (epidermal growth factor receptor) se dimérise lors de la liaison de son ligand et cette étape est nécessaire pour sa liaison à l'AP-2 et son internalisation.

### 2.3.2. Endocytose et dégradation

Les protéines ont une durée de vie définie. Soit parce qu'une régulation négative est nécessaire en réponse à un changement environnemental, soit simplement pour s'assurer que la fonction cellulaire est correctement remplie, les cellules dégradent régulièrement les protéines et fournissent de nouvelles protéines par synthèse. Les protéines ciblées pour la dégradation sont marquées avec l'ubiquitine, une protéine de 76 acides aminés qui peut s'oligomériser pour former des chaînes de polyubiquitine. Après internalisation par EDC, les protéines membranaires mono- et polyubiquitylées sont triées au niveau des endosomes pour être envoyées aux lysosomes pour dégradation par l'action de Rab7 et Rab9 entre autres. L'ubiquitylation se produit souvent lors de la liaison du ligand sur son récepteur, comme c'est le cas pour le R-EGF lors de la liaison à l'EGF et pour certains RCPG tels que le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique ( $\beta$ 2AR) lors de la liaison à l'adrénaline (Acconcia et al., 2009).

### 2.3.3. Endocytose et recyclage

La voie alternative pour les récepteurs internalisés qui ne sont pas destinés à la dégradation est la voie de recyclage. Là encore, le TfR est un récepteur modèle commun pour l'étude de cette voie. Certains lipides, comme les glycosphingolipides, suivent également cette voie. Le tri entre les compartiments de recyclage et les endosomes tardifs se fait au niveau des endosomes précoces. L'environnement légèrement acide de ces compartiments peut favoriser des changements conformationnels qui permettront aux ligands de se détacher de leur récepteur. Les récepteurs non liés seront ensuite acheminés vers les endosomes de recyclage et retournés à la membrane plasmique pour un nouveau cycle (Dautry-Varsat et al., 1983). Cette voie de trafic est probablement régulée par les protéines Rab4, Rab11 et Rab35 (Sönnichsen et al., 2000).

### 2.3.4. Endocytose et signalisation

De nombreuses protéines de signalisation sont internalisées par l'EDC. La conséquence la plus évidente de cette observation est que le retrait d'un récepteur de la membrane plasmique l'empêchera de se lier à son ligand, empêchant ainsi son effet. Ceci est important par exemple dans la neurotransmission

où l'élimination des canaux sodiques de la surface cellulaire diminue l'efficacité de la communication neuronale (« Endocytose et neurotransmission » p 61). L'endocytose peut également mettre fin à la cascade de signalisation déclenchée par les récepteurs activés liés aux ligands. On peut y parvenir, comme on l'a vu plus haut, par dissociation ligand-récepteur due à l'environnement acide des vésicules et endosomes (French et al., 1995), ou par ségrégation spatiale des différents acteurs d'une cascade de signalisation. Ce dernier scénario peut être illustré par la ségrégation de PLC $\gamma$ , un effecteur de nombreux RCPG, et de son substrat PI(4,5)P<sub>2</sub> sous forme de lipides vésiculaires qui sont transformés en PI(3)P. D'autre part, les endosomes peuvent servir d'amplificateurs de signaux ou de plates-formes de signalisation. Si le ligand ne perd pas son affinité pour son récepteur dans les endosomes, la compartimentation en un petit volume peut augmenter la concentration du ligand disponible pour le récepteur. Ce peut être le cas de l'EGFR, dont il a été démontré qu'il reste lié au ligand dans les endosomes, ainsi que du récepteur  $\beta$ 2 adrénergique qui reste associé à sa protéine adaptatrice  $\beta$ -arrestine après internalisation. De plus, certaines molécules de signalisation peuvent nécessiter la présence de PI(3)P ou un pH acide pour être activées (Sorkin and Von Zastrow, 2009). Une étude récente sur une lignée cellulaire cancéreuse a mis en évidence que les plaques de clathrine assemblées à la membrane plasmique peuvent servir de structures de mécanotransduction qui détectent la rigidité du substrat. En effet, ces plaques de clathrine ne serviront pas à la formation de vésicules d'endocytose mais seront utilisées comme plateformes de signalisation pour augmenter la prolifération cellulaire par activation de la voie Erk (Baschieri et al., 2018).

### 2.3.5. Endocytose et migration

La migration des cellules est à la base de multiples processus allant du développement embryonnaire à la cicatrisation et à la métastase du cancer. Elle résulte du renouvellement des sites d'adhésion focale caractérisés par la présence d'intégrines, c'est-à-dire de récepteurs transmembranaires constitués de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui permettent la liaison des cellules avec la matrice extracellulaire (MEC). Il a été démontré que le désassemblage des adhérences focales est nécessaire et dépend de l'EDC pour la migration cellulaire. Les principaux adaptateurs des intégrines dans ce processus sont ARH et Dab2 qui lient la queue cytoplasmique de la  $\beta$ -intégrine (Ezratty et al., 2009). L'endocytose des intégrines et d'autres protéines d'adhésion a également été impliquée dans le guidage des axones pendant le développement. Bien que ce phénomène n'implique pas la migration du corps cellulaire, le bout antérieur d'un axone émergent, appelé cône de croissance, doit s'étendre à travers un réseau croissant de neurones pour former des connexions dans la zone correcte du cerveau en développement. Il a été démontré que l'EDC est impliquée à la fois dans l'internalisation des protéines d'adhésion L1 à la base

du cône de croissance pour l'aider à croître (Kamiguchi and Lemmon, 2000) et pour l'internalisation de  $\beta$ 1-integrine, à son extrémité, pour le faire évoluer (Hines et al., 2010).

### 2.3.6. Endocytose et polarité cellulaire

Les cellules ne sont jamais parfaitement symétriques, mais certains types cellulaires possèdent des caractéristiques morphologiques très évidentes, de sorte que leur membrane et leur organisation intracellulaire forment des domaines distincts et orientés. Cette asymétrie est connue sous le nom de polarité cellulaire qui peut être soit transitoire, comme lors de la division asymétrique des cellules souches ou encore de la migration cellulaire, soit permanente, comme c'est le cas pour les cellules épithéliales et les neurones. L'établissement de la polarité cellulaire se fait principalement par exocytose régulée. Cependant, l'exclusion des protéines des domaines cellulaires spécialisés peut également être obtenue par endocytose régulée (Horton and Ehlers, 2003). L'EDC constitutive est également nécessaire pour le maintien de cette polarité, avec un équilibre constant entre le recyclage et la dégradation des régulateurs de polarité. Inversement, les mécanismes d'endocytose peuvent être modifiés par les régulateurs de polarité même si les mécanismes moléculaires induisant une telle régulation, via l'activation de GTPase ou l'activité kinase par exemple, ne sont pas clairs (Shivas et al., 2010).

### 2.3.7. Endocytose et neurotransmission

La communication neuronale dépend de la libération régulée de neurotransmetteurs par exocytose des vésicules synaptiques (VS) à des sites de libération présynaptiques spécialisés dans des zones actives, déclenchée par une augmentation calcique (Dittman and Ryan, 2009; Haucke et al., 2011; Kononenko and Haucke, 2015; Rizzoli, 2014; Saheki and De Camilli, 2012). Pour empêcher l'expansion de la membrane plasmique présynaptique et maintenir la neurotransmission, l'exocytose des vésicules synaptiques est suivie d'une internalisation compensatoire de la membrane plasmique et de la reformation des vésicules synaptiques. L'analyse au microscope électronique (EM) des jonctions neuromusculaires stimulées des grenouilles (Heuser and Reese, 1973) et les travaux sur les synapses des mammifères ont suggéré que les membranes des vésicules synaptiques sont recyclées par l'EDC à la membrane plasmique (Dittman and Ryan, 2009; Granseth et al., 2006; Saheki and De Camilli, 2012). Cependant le rôle de l'EDC a été largement remis en cause dans les conditions de température physiologique (37°C) où un mode d'endocytose « ultrarapide » entre en jeu (Watanabe et al., 2013). Celui-ci ne dépend pas de la clathrine mais de la dynamine, de l'actine et de l'endophiline (Kononenko et al., 2014; Soykan et al., 2017; Watanabe et al., 2014, 2018). La clathrine intervient mais pour la formation de vésicules à partir de vacuoles intracellulaires qui contiendraient, contrairement aux

endosomes classiques, le PI(4,5)P<sub>2</sub> pour permettre la liaison d'AP-2 (Kononenko et al., 2014; Watanabe et al., 2014).

### 2.3.8. Endocytose et mitose

La cytokinèse est l'étape finale de la mitose, la phase du cycle cellulaire par laquelle une cellule mère se divise en deux cellules filles. La séparation physique réelle s'appelle l'abscission. Il y a un débat en cours quant à savoir si l'EDC est abolie ou non perturbée par la mitose. Certaines études rapportent cependant que l'EDC peut être importante pour la cytokinèse (Schweitzer et al., 2005). Il est également intéressant de noter que l'abscission et l'EDC possèdent des caractéristiques communes, comme des membranes très courbes et un événement de scission final, et que certains acteurs moléculaires, tels que Rab11 et Rab35, sont impliqués dans les deux processus. Cependant, ces résultats reflètent l'importance du système endosomal en tant que plate-forme de signalisation dans la cytokinèse plus qu'une implication de l'internalisation dépendante de la clathrine à partir des particules en soi (Gould and Lippincott-schwartz, 2009).

## 2.4. Visualisation de l'endocytose

Les données recueillies à partir de diverses observations ont grandement contribué à l'établissement du modèle consensus de l'EDC décrit ci-dessus. Le développement d'outils permettant de visualiser le recrutement séquentiel de protéines aux sites d'endocytose a été crucial. Les détails techniques de ces outils sont abordés dans le prochain chapitre de cette introduction. Il est important de noter cependant qu'une question sera soulevée plusieurs fois tout le long de ce chapitre : *que signifie « visualiser l'endocytose » ?*

### 2.4.1. Internalisation de cargo

L'internalisation de cargo est la conséquence même de l'endocytose, ainsi l'étude de ce mécanisme est fréquemment utilisée pour mesurer l'endocytose cellulaire. Ces cargos peuvent être des marqueurs de la phase liquide extracellulaire (Dextran) (Sojakkka et al., 1999), des marqueurs liposolubles (FM1-43) (Betz and Bewick, 1992) ou encore des protéines marquées (Transferrine) (Damke et al., 1994). Cependant la mesure de l'internalisation du Dextran ou de sondes fluorescentes FM n'est pas spécifique d'une voie seule voie d'endocytose. En revanche, l'internalisation de la transferrine (Tfn) marquée permet d'étudier spécifiquement la voie de l'EDC dans des cellules, traitées ou non, avec des agents perturbateurs de cette voie. Cette méthode est la plus utilisée et consiste à incuber les cellules avec de la Tfn couplée à un fluorophore, sur des périodes de temps variables, suivi d'un *stripping* (décapage) qui permet de décrocher la Tfn non endocytée présente à la surface de la

membrane plasmique. Ainsi, seule la fraction de Tfn internalisée est mesurée. D'autres protocoles, tels que les « antibody feeding assays », utilisent des anticorps couplés à des fluorophores, dirigés contre un récepteur d'intérêt, qui permettent de visualiser l'endocytose des récepteurs endogènes qui ont été éventuellement liés par les anticorps (Figure 18).

Bien que ces techniques permettent d'évaluer le taux d'internalisation d'un cargo spécifique à une voie d'endocytose, leur résolution temporelle reste très limitée. Elles ne permettent notamment pas de déterminer à quel moment ces vésicules ont été formées, ni l'endroit précis de l'évènement de scission ayant entraîné la formation de ces vésicules.

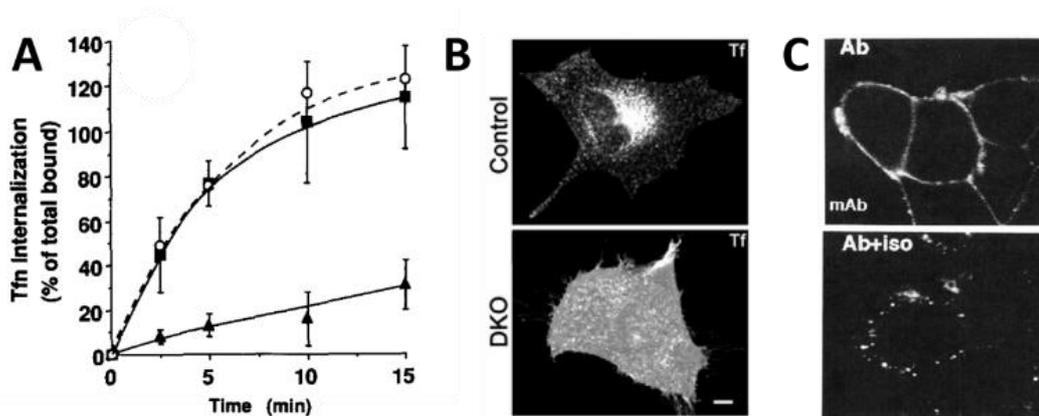


Figure 18 | Exemples d'expériences d'internalisation de la transferrine et d'anticorps.

**(A)** Evolution temporelle de l'internalisation de la Tfn dans des cellules HeLa : (o) cellules non transfectées, (■) cellules transfectées avec la dynamine sauvage ou (●) cellules transfectées avec des formes mutées de dynamine impactant son activité GTPase. Les cellules ont été incubées avec de la Tfn biotinylée pendant la période de temps indiquée avant d'être soumises à des décapages de surface par réduction du pont disulfure liant la Tfn à la biotine. **(B)** Images d'une cellule contrôle (haut) et d'une cellule où l'expression des isoformes 1 et 2 de la dynamine sont supprimées (DKO) (bas) incubées pendant 15 min avec de la Tfn couplée au fluorophore Alexa 594 (10 µg/ml). Dans les cellules contrôles, la Tfn-A594 se trouve principalement au niveau intracellulaire et dans les endosomes tandis que dans les cellules DKO pour la dynamine, la Tfn se retrouve à la surface plasmique. **(C)** Internalisation d'anticorps dirigés contre le récepteur  $\beta$ 2-adrénergique en présence ou en absence de son antagoniste l'isoprotérénol.

Source : Adaptées de (A) Damke et al., 1994 ; (B) Ferguson et al., 2009 ; (C) Von Zastrow and Kobilka, 1994c

#### 2.4.2. Visualisation de la dynamique de la clathrine

Pour l'étude de l'EDC, une autre méthode utilisée pour déterminer le moment et le site précis de formation d'une vésicule est de regarder la dynamique du profil de fluorescence de la clathrine. En effet, plusieurs études utilisent l'étape de déshabillage de la clathrine comme référentiel temporel pour déterminer la cinétique de recrutement des autres molécules participant à la régulation de la formation d'une vésicule. Comme décrit précédemment dans le schéma canonique de l'EDC, le déshabillage du manteau de clathrine est lié à la formation d'une nouvelle vésicule. Ainsi la co-

expression de la clathrine et d'une protéine d'intérêt permet de déterminer à quel moment de l'étape de formation de la vésicule, cette protéine d'intérêt intervient. Des exemples du profil de recrutement transitoire de la clathrine sont illustrés dans la Figure 19.

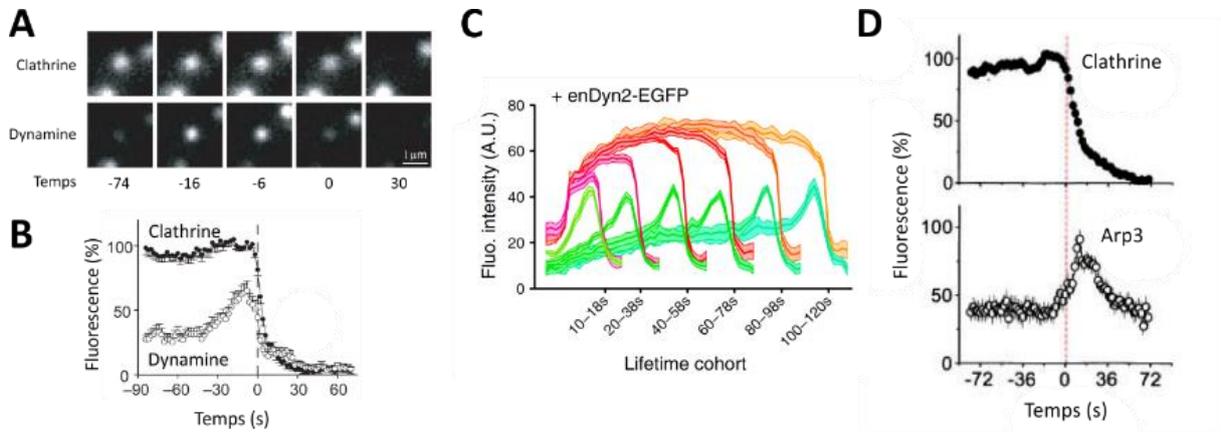


Figure 19 | Profils de recrutement de protéines alignés au moment de la disparition de la clathrine.

**(A)** L'extinction de la fluorescence de la clathrine est précédée de quelques secondes par un saut du niveau de fluorescence de la dynamine. **(B)** La moyenne des profils de fluorescence indique que la dynamine se concentre au niveau des PRC de façon transitoire avant la scission, puis disparaît en quelques secondes suite à la disparition de la clathrine. **(C)** Profil de recrutement de la dynamine (vert/cyan) alignés en fonction des différentes cohortes de temps de fluorescence de la clathrine (rose/orange). **(D)** Profil de recrutement d'Arp3 (un nucléateur de l'actine) est similaire au profil de recrutement de la dynamine (B), suggérant que l'actine peut être nécessaire après le déshabillage du manteau de clathrine.

Source : Adaptées de (A-B) Merrifield et al., 2002 ; (C) Aguet et al., 2013 ; (D) Merrifield et al., 2004

En partant de l'hypothèse que la disparition de la clathrine est un bon indicateur de la formation d'une vésicule, tout traitement entraînant un rallongement de la durée de vie de ces structures de clathrine implique une inhibition de la formation de vésicules. Par exemple, la perturbation de l'activité GTPase de la dynamine ou encore la stimulation des GPCR entraînent un blocage ou un ralentissement de la dynamique de la formation vésiculaire (Figure 20).

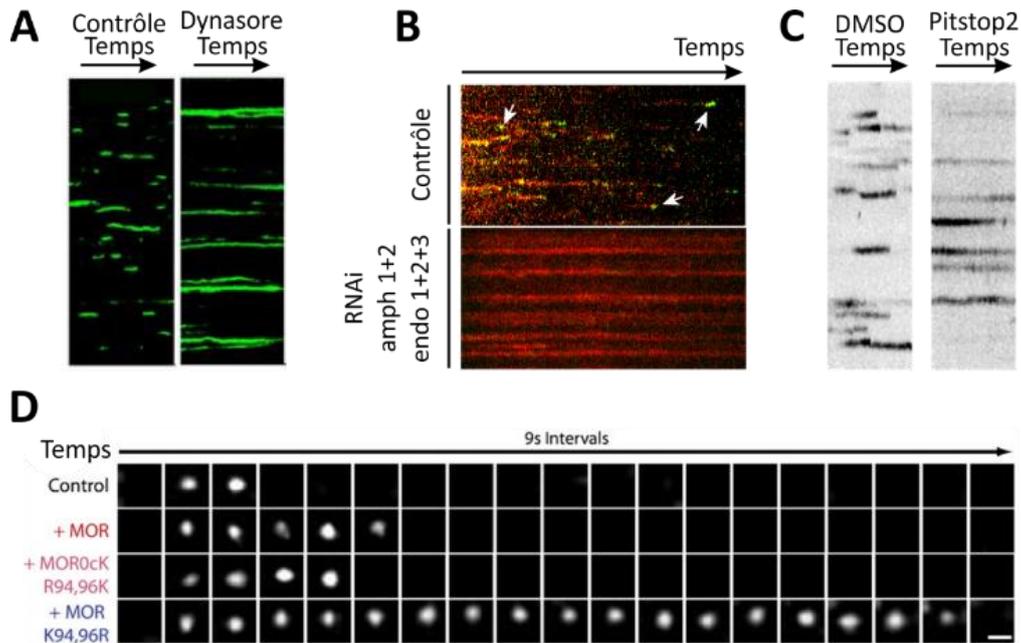


Figure 20 | Observation des temps de vie des structures de clathrine pour évaluer l'activité d'endocytose et l'effet de son inhibition.

(A-C) Kymographes montrant les points de clathrine au cours du temps. Le temps de vie de la clathrine à la membrane plasmique est grandement augmentée par (A) l'application de dynasore, un inhibiteur puissant de l'activité GTPase de la dynamine, (B) et l'application de pitstop2, une petite molécule qui se lie au domaine terminal de la clathrine. (D) Le temps de résidence des structures de clathrine à la membrane plasmique est aussi augmentée par l'agrégation des récepteurs  $\mu$ -opioïdes (MOR) induite par des agonistes. Des mutations ponctuelles favorisant (R94,96K) ou empêchant (K94,96R) son ubiquitylation affectent aussi ce phénomène.

Source : Adaptées de (A) Macia et al., 2006 ; (B) Meinecke et al., 2013 ; (C) von Kleist and Haucke, 2012 ; (D) Henry et al., 2012

Même si dans la plupart des cas une augmentation du temps de vie de la clathrine peut être corrélée à une réduction de l'internalisation de cargo (mesurée par des essais d'internalisation), il est aussi important de noter que la clathrine n'est pas le seul acteur majeur intervenant lors de la formation de vésicules. En effet, l'observation seule de la dynamique des structures de clathrine pour la détermination des internalisations peut entraîner des biais de deux façons différentes. Premièrement, les structures de clathrine ayant un temps de vie réduit (en dessous de 10 s) sont souvent considérées comme « non productives » dû au fait que ce temps est bien trop court pour que toute la machinerie nécessaire pour l'invagination et la scission soit mise en place et puisse jouer son rôle (Ehrlich et al., 2004; Loerke et al., 2009). Bien que cette hypothèse puisse faire sens, l'observation de l'évolution de la clathrine seule ne suffit pas à la valider. En effet, l'exclusion de ces structures (ayant un temps de vie réduit) des analyses peut sous-estimer l'activité d'endocytose de la cellule. Deuxièmement, il est connu que les structures de clathrine présentant des temps de vie de longue durée peuvent murir sur plusieurs intervalles de temps jusqu'à la formation d'une vésicule, et ce avant même que le signal de clathrine ne disparaisse dû au déshabillage du manteau de clathrine. Des études menées par mon

laboratoire sur des lignées cellulaires (Merrifield et al., 2005; Taylor et al., 2011) et sur des cellules primaires comme les neurones d'hippocampe (Rosendale et al., 2017) suggèrent la possibilité que ces plaques de clathrine de longue durée peuvent subir plusieurs cycles d'internalisation de cargo avant même que la clathrine marquée ne disparaisse. En conclusion, le postulat de la correspondance entre disparition de la clathrine et scission est contexte-dépendant et il se peut que la plupart de ces études sous-estiment la capacité de formation de vésicules.

### 2.4.3. Les déterminants morphologiques

Une technique récente permet de combiner la microscopie de fluorescence et la microscopie électronique (technique CLEM pour *Correlative Light Electron Microscopy*) (Kukulski et al., 2012). Ce double-système a été utilisé pour étudier le recrutement de protéines associées à la morphologie des puits recouverts de clathrine durant leur invagination. Ainsi dans une étude faite sur les levures *Saccharomyces cerevisiae*, il a été démontré, par microscopie de fluorescence sur cellules vivantes, qu'un couple de protéines qui marquent les sites d'endocytose (non résolu à cause de la diffraction du signal) est recruté systématiquement de façon séquentielle. Puis, à partir d'un échantillon fixé, il a été possible de corréler la signature protéique de chacune de ces protéines avec la morphologie ultra-structurale de la membrane plasmique au niveau de cette région cellulaire (Figure 21).

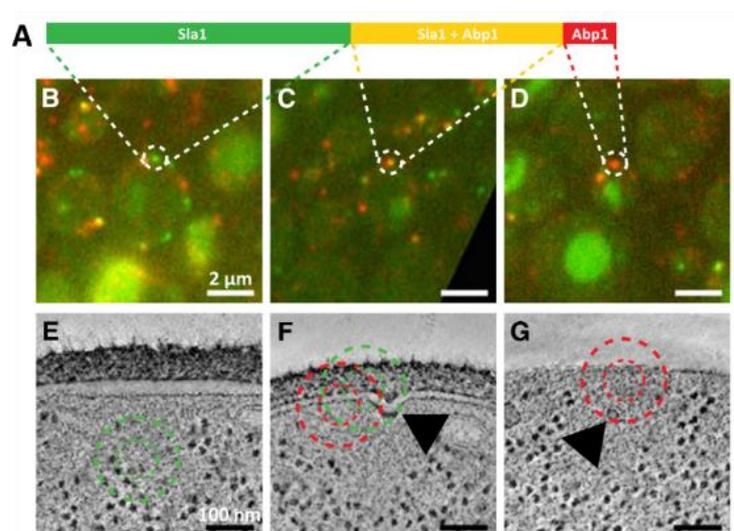


Figure 21 | Signatures protéiques et changements morphologiques dû à la formation de vésicules recouvertes de clathrine.

**(A)** Séquence d'arrivée aux puits recouverts de clathrine de Sla1-EGFP, une protéine adaptatrice des levures, et de Abp1-mCherry, une protéine qui se lie au cytosquelette d'actine. **(B-D)** Images de fluorescence de cellules fixées montrant des points positifs soit pour Sla1, soit pour Sla1 et Abp1, soit pour Abp1 seulement. **(E-G)** Aucun profil d'endocytose **(E)** n'est observé aux points marqués pour Sla1, **(F)** des invaginations membranaires peuvent être observées aux points positifs pour Sla1 et Abp1 (tête de flèche) et **(G)** des vésicules complètement formées à proximité de la membrane plasmique dans les points positifs pour Abp1 (tête de flèche).

Source : Adaptée de Kukulski et al., 2012

L'avantage de cette technique réside dans le fait qu'elle permet de déterminer de façon univoque si une vésicule s'est détachée de la membrane plasmique et de rapporter précisément la présence de protéines d'endocytose localisées à des sites de scission vésiculaire. Néanmoins, l'utilisation d'échantillon fixés empêche l'étude de la dynamique de l'endocytose, comme par exemple, la détermination du moment de scission vésiculaire. La technique CLEM a également été appliquée aux cellules de mammifères (Avinoam et al., 2015) ce qui a permis de trancher en faveur d'un modèle d'invagination d'un PRC plat (« La clathrine » p53).

Deux techniques de mesure des invaginations membranaires, la microscopie à force atomique de grande vitesse (HS-AFM, pour High-Speed Atomic Force Microscopy) (Yoshida et al., 2018) ou la microscopie de conductance ionique (ICM, pour Ionic Conductance Microscopy) (Shevchuk et al., 2012) combinées à la microscopie de fluorescence ont montré la correspondance entre PRC (marqués par clathrine-GFP) et invaginations membranaires (Yoshida et al., 2018). Ainsi les changements morphologiques détaillés de la membrane plasmique, ainsi que l'assemblage des protéines, comme la clathrine, ont été imagés et analysés pour comprendre le processus de la formation des vésicules d'endocytose (Figure 22). De façon inattendue, certains événements de scission sont accompagnés d'une protrusion de la membrane qui correspondrait à l'apparition d'un filopode sur le côté du PRC. Il reste à comprendre la généralité de ce type de mécanisme.

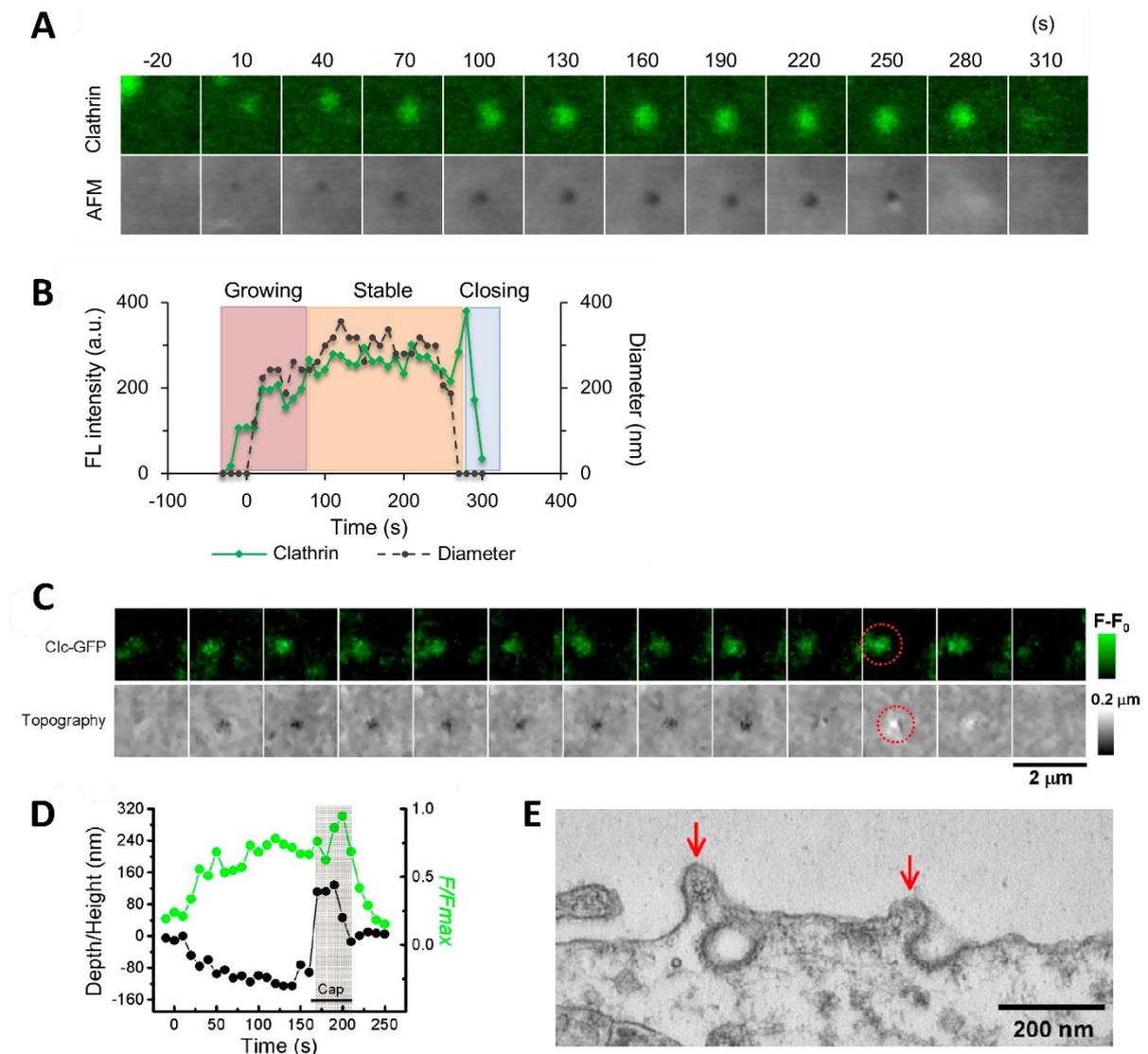


Figure 22 | Combinaison de l'imagerie confocale et HS-AFM révèle les changements morphologiques des PRC dans les cellules vivantes.

**(A)** (Haut) Image de fluorescence de la clathrine (en vert) et (bas) image représentant un PRC par HS-AFM. **(B)** L'intensité de fluorescence (en vert) et le diamètre des PRC des images HS-AFM (en pointillés noirs) du panel (A) sont représentés en fonction du temps. Sur la base du signal de clathrine, l'ensemble du processus est divisé en une phase de croissance (rouge), une phase stable (orange) et une phase de fermeture (bleu) du PRC. **(C)** Les paires d'images confocales topographiques et fluorescentes montrent la formation, la croissance, l'état d'équilibre et la fermeture d'un PRC. La formation d'une protubérance, observée sur l'image topographique, se produit juste avant la fermeture du PRC et la disparition de la fluorescence Clc-GFP (cercles rouges). **(D)** Exemple d'une trace typique de la profondeur et de la hauteur de cette protubérance et des changements correspondants de fluorescence Clc-GFP pendant la formation, la maturation et la fermeture du PRC avec la formation de la protubérance (cap). **(E)** Image de microscopie électronique à transmission montrant la présence de protrusions à côté des PRC invaginés.

Source : Adaptées de (A-B) Yoshida et al., 2018 et (C-E) Shevchuk et al., 2012

#### 2.4.4. Observation de la scission vésiculaire

La technique de pH pulsé (ppH, « Le protocole d'échange de pH extracellulaire – Le protocole ppH » p103) a été développée dans le but de surpasser les limitations imposées par les techniques décrites ci-dessus, c'est-à-dire, de pouvoir visualiser l'internalisation de cargo dans des cellules vivantes, indépendamment de la dynamique des protéines du manteau, et ce avec une résolution temporelle optimale par rapport au temps nécessaire pour la formation d'une vésicule (Perrais and Merrifield, 2005). Cette technique permet d'évaluer si des cargos de récepteurs sont à la surface cellulaire ou dans des vésicules intracellulaires toutes les deux secondes grâce à l'utilisation d'un marqueur sensible au pH. Ainsi, il est possible de visualiser la formation de nouvelles vésicules avec une résolution temporelle de deux secondes. De façon importante, cette méthode a pu montrer que des vésicules contenant un cargo peuvent se former sans présenter de liens évidents avec les altérations du niveau de marquage de la clathrine. D'autre part, elle a permis d'étudier le profil de recrutement de dizaines de protéines par rapport à l'évènement de scission (Taylor et al., 2011) (Figure 23).

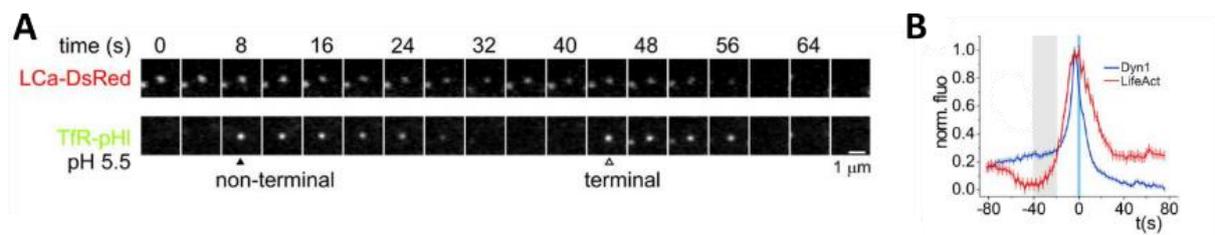


Figure 23 | Le protocole de pH pulsé révèle la dynamique des protéines d'endocytose.

**(A)** Les vésicules nouvellement formées contenant le récepteur à la transferrine (TfR-pHI) apparaissent au niveau des PRC préexistants. La première vésicule (non terminale) serait passée inaperçue si l'on avait uniquement observé le marquage de clathrine. La deuxième vésicule (terminale) se forme ~18 secondes avant l'extinction de la clathrine. **(B)** Profils de recrutement de la dynamine et du LifeAct (un peptide se liant aux filaments d'actine) alignés par rapport au temps de détection des vésicules, c'est-à-dire 2 secondes après la scission. On peut observer un pic de recrutement de la dynamine plus marqué en comparaison de ce qui a été montré en Figure 19B. Une autre différence est visible avec Arp3 qui atteint son pic de recrutement plus tardivement, suite à l'alignement avec l'extinction du signal de la clathrine, comparé au pic de recrutement du LifeAct, aligné sur la scission. Ceci reflète très probablement les incertitudes dérivant de l'utilisation du déshabillage du manteau de clathrine comme point de référence pour la formation vésiculaire.

Source : Adaptée de (A) Perrais and Merrifield, 2005 ; (B) Taylor et al., 2011

Compte tenu de ces avantages, cette technique a donc été amplement utilisée pour aboutir au projet scientifique présenté dans ce manuscrit. Cette technique sera donc mieux décrite dans la partie Matériel et Méthodes (« Matériels et Méthodes » p99).

## 3. La dynamine

### 3.1. Découverte de la dynamine

Les dynamines appartiennent à une famille de GTPases qui remplissent des fonctions cellulaires essentielles et tirent leur nom d'une erreur sur leur supposé rôle dans la régulation du transport sur les microtubules. La dynamine a été découverte à l'origine dans le cerveau et identifiée comme partenaires de liaison des microtubules en tant que GTPase (pour guanine triphosphatase) mécano-chimique (Shpetner and Vallee, 1989). Cette activité de liaison aux microtubules pourrait être liée à la régulation de la stabilité des microtubules pendant la mitose (Ishida et al., 2011). La découverte de la mutation *shibire*, menant à un phénotype paralytique thermosensible conditionnel chez la *Drosophila melanogaster* (van der Bliek and Meyerowitz, 1991; Chen et al., 1991; Kim and Wu, 1987; Koenig et al., 1989), a démontré que le principal rôle de la dynamine est la scission des vésicules recouvertes de clathrine lors de l'endocytose. La dynamine est une macromolécule de 100 kDa, ayant des rôles multiples dans les processus de mise en forme des membranes. Plus particulièrement, elles jouent un rôle clé dans l'endocytose des récepteurs et le recyclage des vésicules synaptiques (Antonny et al., 2016; Ferguson and De Camilli, 2012; Singh et al., 2017). En effet, la dynamine polymérise pour former une structure en forme de collier autour du cou des vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine et les changements de conformation dépendants de l'hydrolyse du GTP qui en résultent entraînent la déformation de la membrane nécessaire à la scission vésiculaire (Bashkirov et al., 2008; Cocucci et al., 2014; Liu et al., 2013; Pucadyil and Schmid, 2008). Elles sont également impliquées dans l'absorption des pathogènes viraux et bactériens (Harper et al., 2013) et dans la motilité des cellules cancéreuses métastatiques (Meng, 2017). Enfin, un rapport récent démontre son rôle dans la fission mitochondriale, une fonction différente de la scission vésiculaire canonique (Lee et al., 2016), rôle classiquement tenu par un autre membre de la famille des dynamines, Drp-1 (« Les protéines de type dynamine » p 71).

### 3.2. Les isoformes de la dynamine

Les membres de la famille des dynamines se retrouvent dans tout le royaume eucaryote. Cette famille comprend la dynamine 1 (DNM1), la dynamine 2 (DNM2) et la dynamine 3 (DNM3), appelées **dynamines classiques**. Les trois dynamines ont des modes d'expression différents. La dynamine 1 s'exprime principalement dans les neurones et les tissus cérébraux et joue un rôle de médiateur dans le recyclage des vésicules synaptiques (Ferguson et al., 2007; Nakata et al., 1991). La dynamine 2 est exprimée de façon ubiquitaire et est impliquée dans l'endocytose des récepteurs (Cook et al., 1994). La dynamine 3 est exprimée dans les testicules, les poumons et le cerveau où elle a un rôle

apparemment similaire à celui de la dynamine 1 bien qu'exprimée moins fortement (Raimondi et al., 2011). Dans mon manuscrit de thèse j'utiliserai le terme « dynamine » pour désigner les isoformes classiques de la dynamine.

### 3.3. Les protéines de type dynamine

Les dynamines sont les membres fondateurs d'une famille de GTPases connues sous le nom de **protéines de type dynamine** (DLP pour Dynamin-Like Proteins), dont les membres partagent les caractéristiques de base de l'organisation des domaines et les rôles dans le remodelage des membranes (Ishihara, 2004; Janzen et al., 2000; Kuravi, 2006; Praefcke and McMahon, 2004; Rahaman et al., 2008; Vater et al., 1992; Wilsbach and Paynel, 1993). Les caractéristiques communes à toutes les dynamines classiques et DLP sont la présence d'un grand domaine GTPase N-terminal (GD pour GTPase Domain), d'un domaine milieu (MD pour Middle Domain) et d'un domaine effecteur GTPase (GED pour GTPase Effector Domain) (Figure 24). Le domaine GTPase lie et hydrolyse le GTP, et les domaines MD et GED jouent quant à eux un rôle important dans l'oligomérisation et la régulation de l'activité GTPase. La dynamine classique contient deux autres domaines, soit le domaine d'homologie de la pleckstrine (PHD pour Pleckstrin Homology Domain) impliqué dans la liaison membranaire et un domaine riche en proline (PRD pour Proline-Arginine Rich Domain) contenant plusieurs sites de liaison au domaine SH3 pour les interactions protéiques (Hinshaw, 2000). Bien qu'elles n'aient pas de domaine PH, toutes les DLP connues s'associent à des membranes pour remplir leurs fonctions. Dans cette famille de DLP, certaines protéines agissent de la même façon que la dynamine dans la médiation de la scission membranaire. Par exemple, la protéine 1 apparentée à la dynamine (DRP 1) est importante pour la fission des mitochondries et des peroxysomes (Detmer and Chan, 2007; Hoppins et al., 2007; Okamoto and Shaw, 2005; Westermann, 2010). Drp1 a aussi été impliquée directement dans l'endocytose des vésicules synaptique en interagissant avec la clathrine dans un complexe contenant les protéines mitochondriales Bcl-xL et Mff (Li et al., 2013). D'autres sont des membres plus éloignés et servent de médiateurs pour la fusion homotypique des membranes. Il s'agit notamment de la mitofusine, qui contrôle la fusion des membranes externes mitochondriales, de l'homologue de l'atrophie optique 1 (OPA1), qui est importante pour la fusion de la membrane mitochondriale interne, et de l'atlastine, qui intervient dans la fusion des membranes du réticulum endoplasmique (Hu et al., 2009; Orso et al., 2009).

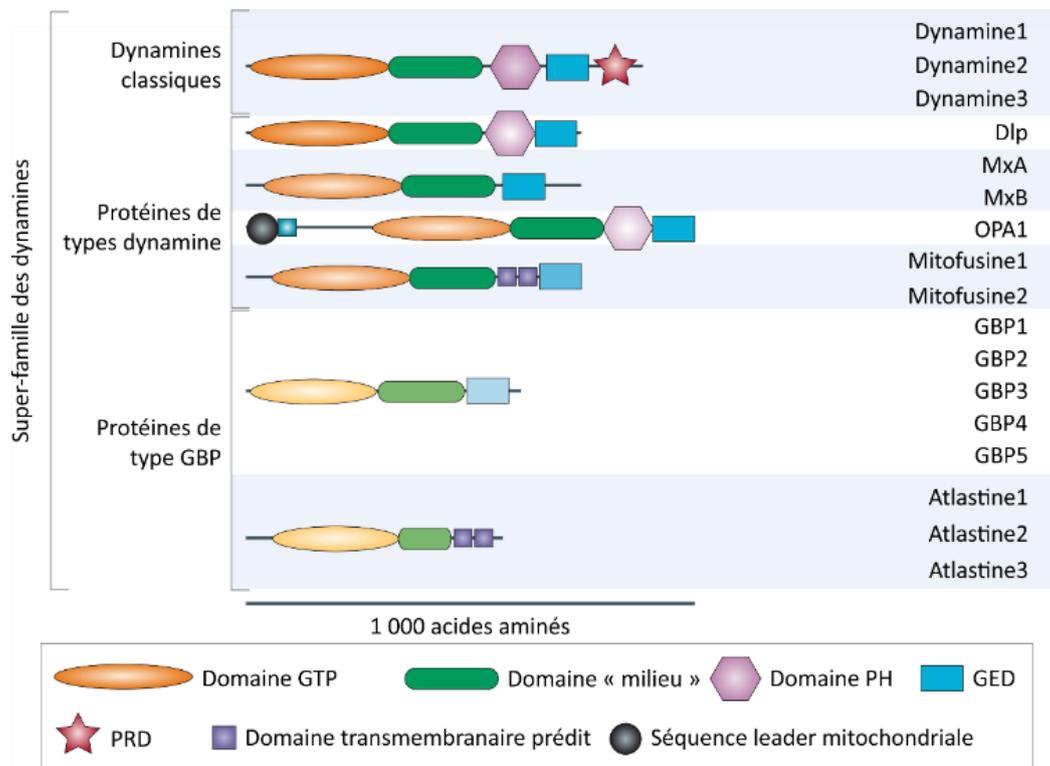


Figure 24 | Structure des domaines de la super-famille de la dynamine.

Les domaines sont représentés par différents symboles et les intensités décroissantes des couleurs correspondent à une homologie de séquence décroissante. DLP, protéine de type dynamine ; GBP, protéine de liaison au guanylate ; OPA1, atrophie optique 1.

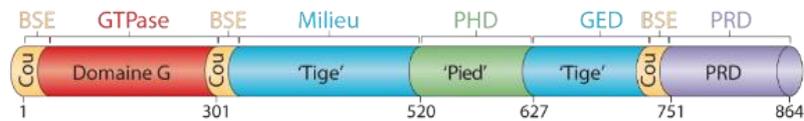
Source : Adaptée de Praefcke and McMahon, 2004

### 3.4. Structure de la dynamine

#### 3.4.1. Les différents domaines de la dynamine et leurs rôles

La dynamine possède cinq domaines (Figure 25) : un grand domaine GTPase en N-terminal (domaine G) ; un domaine BSE ou « cou » ; un domaine effecteur GTPase (GED) et Milieu ou « tige » ; un domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD) ; et un domaine riche en proline et arginine (PRD) (Faelber et al., 2011; Ferguson and De Camilli, 2012; Heymann and Hinshaw, 2009). Cette nouvelle subdivision, basée sur la structure cristalline de la dynamine 1 (Faelber et al., 2011), ne suit pas des frontières uniquement basées sur la séquence pour les domaines BSE et « tige ». Chacun de ces domaines possède un rôle précis pour la fonction de cette protéine.

### A Dynamine classique



### B

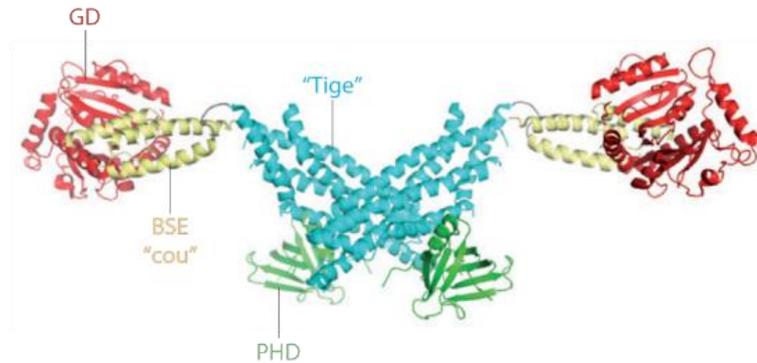


Figure 25 | Représentation linéaire de l'organisation des domaines de la dynamine et de sa structure tridimensionnelle.

(A) Les domaines sont indiqués en différentes couleurs. (B) Structure cristalline d'un dimère de dynamine (sans le PRD) est codée par couleurs pour correspondre à la représentation linéaire.

Source : Adaptée de Ferguson and De Camilli, 2012

#### 3.4.1.1. Le domaine GTPase (domaine G)

Le domaine G globulaire est composé d'un mélange de repliements  $\alpha$ - $\beta$  avec un feuillet  $\beta$  central entouré d'hélices  $\alpha$  des deux côtés, et est nécessaire pour la liaison nucléotidique de la guanine (GTP), entraînant son hydrolyse. Cette structure ressemble à celle du domaine GTPase des GTPases Ras et GBP1, suggérant une origine évolutive commune (Reubold et al., 2005).

#### 3.4.1.2. L'élément de signalisation de faisceau (BSE) ou « cou »

Le domaine G est relié au domaine composé d'un faisceau de trois hélices  $\alpha$ , appelé « élément de signalisation de faisceau » (BSE pour Bundle Signalling Element) ou « cou ». De façon intéressante, les trois hélices sont codées à trois positions distinctes de la séquence polypeptidique, des côtés N-terminal et C-terminal du domaine G et de la région C-terminal du GED, respectivement (Figure 25). Ces positions permettent au domaine BSE, qui est à proximité étroite du domaine G d'être fonctionnellement lié à ce domaine. En effet le BSE transmet les changements de conformation, dépendant des nucléotides de la guanine, du domaine G vers la tige et contrôlerait donc le positionnement et donc l'action de la dynamine sur la membrane et donc sa capacité à permettre la scission membranaire.

### 3.4.1.3. Le domaine effecteur GTPase (GED)

La « tige » est une combinaison du MD et de la partie amino-terminale du GED, elle joue un rôle important dans l'oligomérisation et la régulation de l'activité GTPase. Ces deux domaines, MD et GED, sont liés par le PHD qui interagit directement avec la bicouche de membrane (Faelber et al., 2012; Klein et al., 1998; Ramachandran, 2011).

### 3.4.1.4. Le domaine d'homologie à la pleckstrine (PHD)

Le PHD se trouve après le domaine « tige », et forme le « pied » qui lie la dynamine aux membranes. En effet le PHD possède une surface chargée positivement qui peut lier les phospholipides chargés négativement présents dans le feuillet cytosolique de la membrane plasmique tel que le PI(4,5)P<sub>2</sub>, un lipide membranaire jouant un rôle important dans l'EDC (Ferguson et al., 1994; Harlan et al., 1994; Zheng et al., 1996). Les dimères de dynamine lient également les phospholipides PI(3)P, PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub> et PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Klein et al., 1998; Salim et al., 1996). Les mutants du PHD, qui altèrent la liaison des phosphoinositides, exercent des effets dominants négatifs sur l'EDC (Lee et al., 1999; Vallis et al., 1999). La liaison entre le PHD de la dynamine isolée et les phosphoinositides est de faible affinité (>1 mM), mais cette interaction membranaire est renforcée par une association charge-dépendante avec d'autres phospholipides chargés négativement et par l'avidité apportée par la polymérisation de la dynamine (Bethoney et al., 2009; Zheng et al., 1996). Une boucle hydrophobe émergeant du PHD peut favoriser les interactions membranaires et peut également avoir des propriétés de génération ou de détection de courbure (Liu et al., 2011; Ramachandran et al., 2009), facilitant la scission (Dar and Pucadyil, 2017).

### 3.4.1.5. Le domaine riche en proline (PRD)

Le PRD, qui n'est pas représenté sur la Figure 25, car vraisemblablement non structuré comme de nombreux domaines riches en proline, émergerait entre les domaines BSE et le domaine G, se projetant probablement loin de la membrane, où il pourrait interagir avec d'autres protéines. Le PRD possède plusieurs motifs d'acides aminés « PXXP » (où P est une proline et X n'importe quel autre acide aminé) qui interagissent avec plusieurs domaines d'homologie de Src de type 3 (SH3), présents dans diverses protéines liant la dynamine, comme l'amphiphysine, l'endophiline, l'intersectine et la protéine synaptique de liaison à la dynamine (syndapine) (Anggono et al., 2006; Grabs et al., 1997; Lundmark and Carlsson, 2004; Shpetner et al., 1996; Zamanian and Kelly, 2003). Ces interactions PRD-SH3 sont importantes pour localiser la dynamine aux puits recouverts de clathrine (Gad et al., 2000; Ringstad et al., 1999; Simpson et al., 1999; Takeda et al., 2018). En effet, des expériences sur des fibroblastes n'exprimant plus la dynamine endogène et surexprimant la dynamine sans le domaine PRD, ne peuvent

plus former des vésicules d'endocytose (Ferguson et al., 2009). Les interactions PRD-SH3 sont généralement de faible affinité, mais la présence de multiples motifs de liaison SH3 dans le PRD et de multiples protéines contenant des motifs SH3 aux sites d'endocytose, ainsi que la polymérisation de ces protéines, entraînent un effet d'avidité significatif, qui améliore ces interactions et concentrent la dynamine (Anggono et al., 2006; Rosendale et al., 2018).

### 3.5. Dimérisation de la dynamine

Deux molécules de dynamine peuvent se dimériser par leur domaine « tige » pour former une croix, dans laquelle les deux domaines G sont orientés dans des directions opposées. Ce dimère est l'unité de base de la dynamine (Figure 26A). La forme tétramère de la dynamine, abondante en solution, peut également être un intermédiaire avant la formation de l'hélice (Chappie et al., 2011a; Gao et al., 2010; Ramachandran et al., 2007) (Figure 26B, C). Il existe une autre interface de dimérisation de la dynamine qui est générée par l'interaction de deux domaines G (aussi appelé domaines G-G) se faisant face dans l'hélice (Figure 26C-E). Les dynamines sont capables de former des assemblages supramoléculaires hélicoïdaux autour des tubules lipidiques, par exemple les cous des vésicules naissantes de la membrane plasmique. Les plus petits éléments constitutifs des assemblages hélicoïdaux sont des tétramères de dynamine, dont on pense qu'ils s'assemblent en hélice sans consommation énergétique (Reubold et al., 2015a).

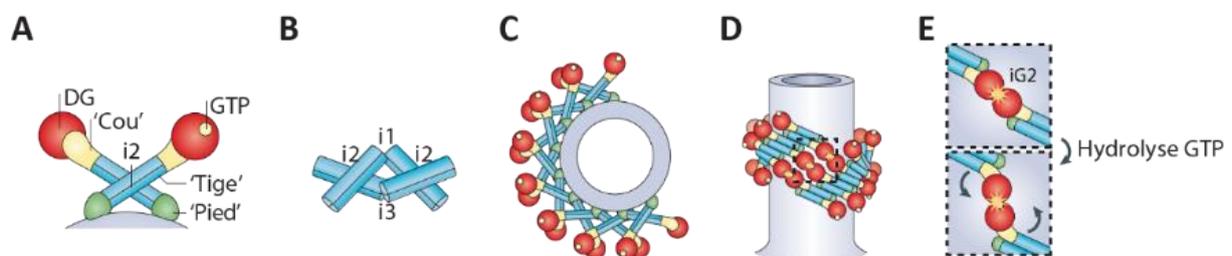


Figure 26 | Représentation des polymères de dynamine.

**(A)** Dimère de dynamine. Le code couleur des domaines est le même que sur les figures 1 et 2 ; le PRD n'est pas représenté. Le dimère se forme suite à l'interaction des domaines tiges à l'interface 2 (i2). **(B)** Le tétramère de dynamine se forme suite à l'interaction de deux dimères aux interfaces 1 (i1) et 3 (i3). **(C, D)** Représentation d'un polymère hélicoïdal de dynamine autour d'un gabarit tubulaire vu d'en haut **(C)** et vu de côté **(D)**. **(E)** Dimérisation dépendante du GTP des domaines G (DG) entre les pas d'hélice à l'interface G2 (iG2) aussi appelé domaines G-G. Cette dimérisation G2 favoriserait l'hydrolyse du GTP en GDP, entraînant un mouvement du cou de la dynamine permettant le resserrement de la membrane et la scission du tubule membranaire.

Source : Adaptée de Ferguson and De Camilli, 2012

### 3.6. Fonctions de la dynamine

Comme mentionné précédemment dans ce manuscrit, la dynamine est essentielle pour catalyser la scission membranaire dans plusieurs formes d'endocytose dont l'EDC. Les 30 dernières années de recherche ont abouti à une meilleure compréhension du fonctionnement de la dynamine. Dans les prochains paragraphes, je présente les trois propriétés de la dynamine fortement appuyées par les données expérimentales qui sont : premièrement **l'oligomérisation** de la dynamine en un polymère **hélicoïdal**, entourant un tube de membrane ; deuxièmement l'oligomère de dynamine **se contracte en présence de GTP** entraînant un rétrécissement de la membrane sous-jacente ; et troisièmement, la dynamine catalyse la **fission des membranes par hydrolyse du GTP**.

#### 3.6.1. Oligomérisation en hélice de la dynamine à la surface des membranes

La dynamine purifiée se polymérise spontanément en anneaux et en hélice lorsqu'elle est incubée dans des solutions à faible concentration ionique ou en présence de gabarits tubulaires étroits chargés négativement (tels que des tubes membranaires, des microtubules ou des faisceaux d'actine) (Hinshaw and Schmid, 1995). Grâce à son oligomérisation, la dynamine peut également tubuler des bicouches de membrane dans des conditions appropriées en formant une hélice (Takei et al., 1998). Les oligomères de dynamine en hélices ont été observés pour la première fois par microscopie électronique autour du cou de bourgeons membranaires dans le mutant *shibire* thermosensible de la drosophile (Koenig and Ikeda, 1989) (Figure 27). L'oligomérisation de la dynamine en solution est favorisée par la liaison à des analogues non hydrolysables du GTP, tels que le GMPPCP, le GTPγS (Warnock et al., 1996) et le GDP•AlF<sub>4</sub> (Carr and Hinshaw, 1997), tandis que l'hydrolyse du GTP favorise le désassemblage des oligomères de dynamine et sa libération de la membrane (Danino et al., 2004; Marks et al., 2001; Warnock et al., 1996). En l'absence de nucléotide, la dynamine s'assemble en une hélice de 50 nm de diamètre extérieur avec un pas d'hélice entre 10 et 20 nm, entourant un tube de membrane de 10 nm de rayon (Chen et al., 2004; Danino et al., 2004; Sweitzer and Hinshaw, 1998). Des études de cryo-microscopie électronique (cryo-EM) ont révélé que l'unité du polymère de dynamine est un dimère antiparallèle, avec les domaines G orientés vers l'extérieur et les domaines PH vers l'intérieur liés à la membrane (Chen et al., 2004; Mears et al., 2007; Zhang and Hinshaw, 2001) (Figure 26A). On a vu précédemment (voir « Dimérisation de la dynamine » p 75) que la dimérisation de la dynamine est également médiée par les domaines « tige » qui forment une croix (Figure 26A). La forme tétramère de la dynamine résulte de l'apposition de dimères via les interactions aux interfaces 1 et 3 des domaine tige (Figure 26B) et produit ainsi un angle qui détermine le diamètre de l'anneau (Figure 26C). Cette forme tétramère peut être abondante en solution et être un intermédiaire dans l'assemblage de l'hélice. Ce sont les interactions entre les dimères via les domaines « tige » qui

entraînent l'assemblage en hélice de la dynamine. Ainsi, les « tiges » forment le centre de l'hélice, tandis que les domaines BSE et G de chaque dimère se projettent vers les autres domaines G et BSE adjacents de l'hélice (Figure 26C). Il s'ensuit que la dimérisation du domaine G, qui est critique pour l'hydrolyse du GTP et pour la fonction de la dynamine, ne peut se produire qu'à travers des échelons/tours adjacents, ce qui explique la forte stimulation de l'activité GTPase de la dynamine lors de la polymérisation (Figure 26D, E). En effet, des données quantitatives sur le nombre de molécules recrutées au moment de la scission *in vivo* montrent que la dynamine se polymérise en hélice de taille variable au niveau du cou des vésicules recouvertes de clathrine correspondant à au moins 26 molécules, ou un tour d'hélice (Figure 27) (Cocucci et al., 2014; Grassart et al., 2014).

### 3.6.2. La dynamine est un catalyseur de fission membranaire dépendant de l'hydrolyse du GTP

La fonction essentielle de la dynamine est d'utiliser l'énergie de l'hydrolyse du GTP pour couper les tubules membranaires. La suppression d'un seul ou de plusieurs gènes de la dynamine arrête la fission du cou des vésicules recouvertes de clathrine au niveau des synapses neuronales et dans les fibroblastes embryonnaires de souris (Ferguson et al., 2007; Park et al., 2013; Raimondi et al., 2011). Des mutants présentant une réduction d'activité GTPase, inhibent l'endocytose du récepteur à la transferrine et prolongent le temps de séjour de la clathrine et de la dynamine à la membrane plasmique (Boll et al., 2004; Kural et al., 2012a; Marks et al., 2001; Song et al., 2004; Taylor et al., 2011, 2012). Les mutants déficients dans leur activité GTPase ont des phénotypes dominants négatifs lorsqu'ils s'assemblent avec des protéines endogènes dans les expériences de surexpression (Damke et al., 1994). Le mécanisme de scission membranaire par la dynamine a été étudié par reconstitution avec des composants purifiés. L'hydrolyse du GTP est constamment requise pour la scission membranaire dans ces systèmes reconstitués (Figure 28) (Bashkirov et al., 2008; Dar et al., 2015a; Mattila et al., 2015; Morlot et al., 2012; Pucadyil and Schmid, 2008; Roux et al., 2006a; Sweitzer and Hinshaw, 1998).

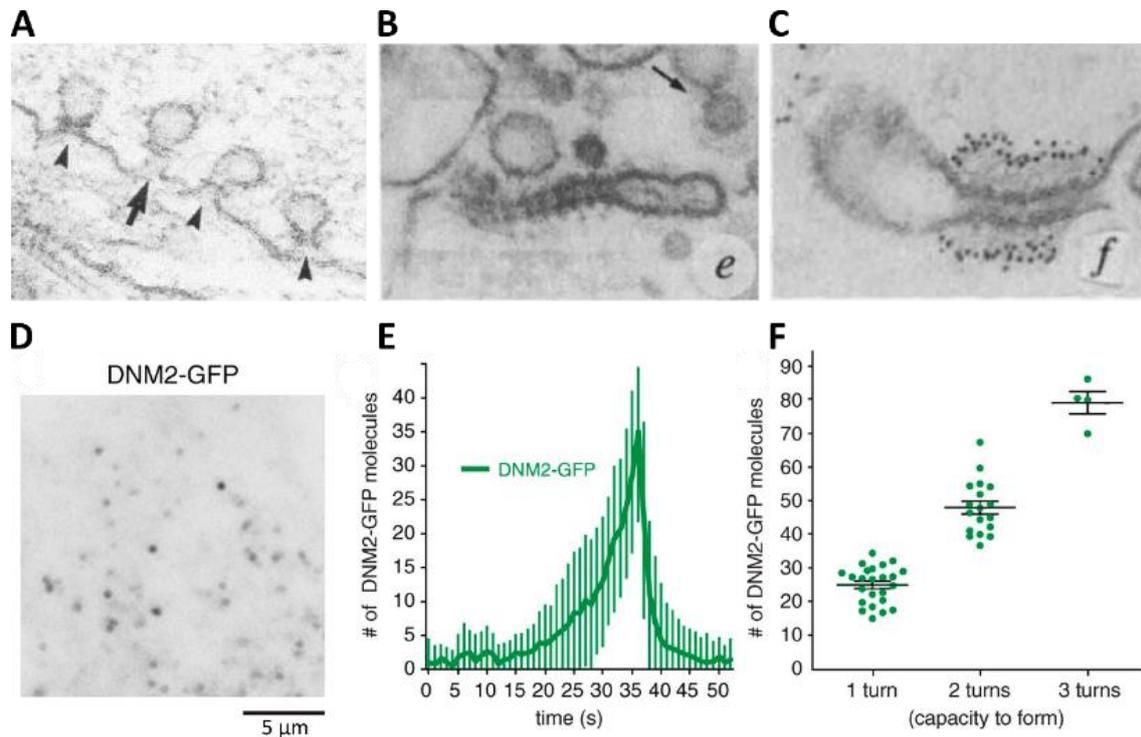


Figure 27 | Exemples de vésicules présentant un « collier » de dynamine autour du cou.

(A) Les flèches indiquent les colliers de dynamine autour du cou des vésicules d'endocytose dans des synapses neuromusculaires de *Drosophila melanogaster*. Les têtes de flèches désignent les colliers de dynamine perçus comme deux lignes parallèles dans le plan. (B-C) Images de microscopie électronique illustrant la formation d'invaginations membranaires tubulaires recouvertes de dynamine régulièrement espacées (B) marquées avec des particules d'or (C), dans des synaptosomes de rat incubés avec du GTP $\gamma$ S. (D-F) Quantification du recrutement de la dynamine 2 aux sites d'endocytose. (D) Image de microscopie TIRF d'une lignée cellulaire génétiquement éditée DNM2<sup>EN-all</sup> SK-MEL-2, exprimant la dynamine2-GFP (DNM2-GFP) de façon endogène. (E) Nombre moyen de molécules DNM2-GFP recrutées sur la membrane plasmique en fonction du temps. (F) Distribution des molécules de DNM2-GFP en fonction de la capacité théorique à former des hélices.

Source : Adaptée de (A) Koenig and Ikeda, 1989 ; (B-C) Takei et al., 1995 ; (D-F) Grassart et al., 2014

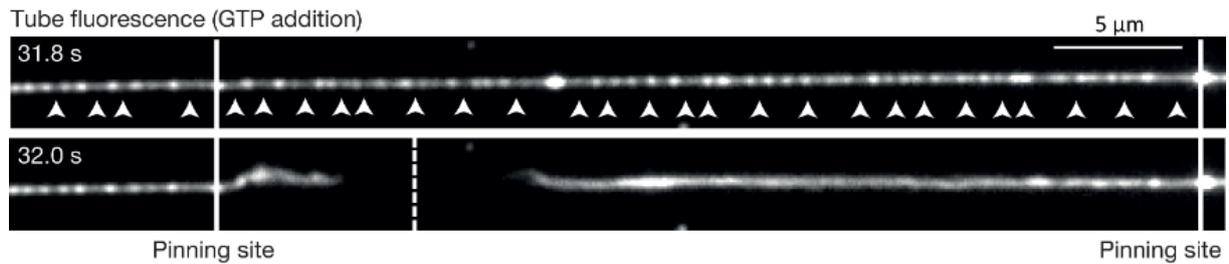


Figure 28 | La dynamine entraîne la scission du tube lipidique par l'hydrolyse du GTP.

Représentation d'un tubule lipidique fixé aux extrémités (lignes pleines) sur lequel de la dynamine préassemblée est additionnée de GTP entraînant la coupure du tubule. La dynamine se désassemble (têtes de flèches blanches) juste après la scission (site de scission marqué par la ligne en pointillé).

Source : Adaptée de Dar et al., 2015

La tension de la membrane, qui peut être fournie par l'adhésion des tubes membranaires à un substrat, facilite cette réaction de fission (Boulant et al., 2011; Danino et al., 2004; Morlot et al., 2012; Roux et al., 2006a; Sweitzer and Hinshaw, 1998). La scission induite par la dynamine se produit dans un état d'hémifission où le feuillet lipidique interne du tubule membranaire disparaît, laissant un cou composé d'une seule couche de lipides, enveloppé par l'hélice de dynamine (Figure 29) (Bashkirov et al., 2008; Mattila et al., 2015; Morlot et al., 2012).

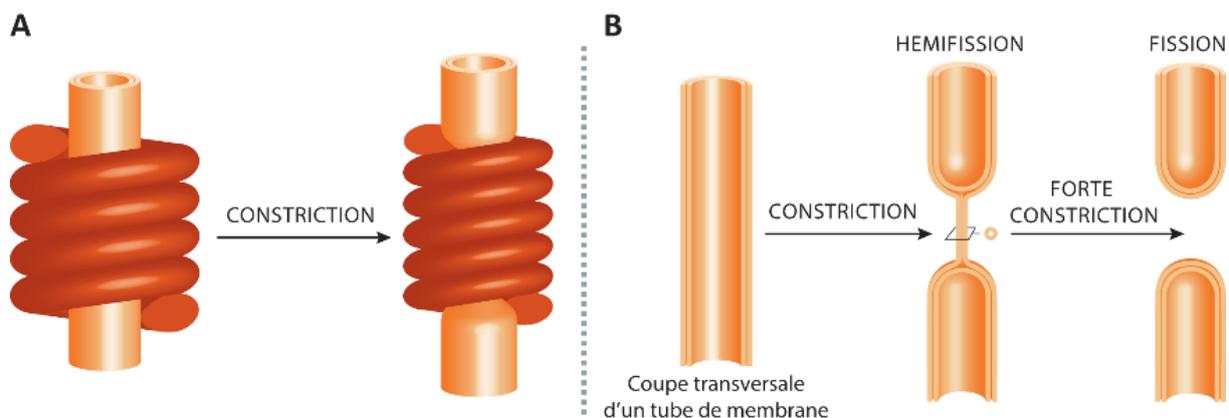


Figure 29 | Modèle de constriction original pour la scission membranaire par la dynamine.

La dynamine oligomérisée en hélice autour du tube membranaire (A) rétrécit par constriction la bicouche lipidique membranaire, ce qui génère une hémifission du feuillet interne (B). Puis par constriction plus importante, la scission de la membrane est réalisée.

Source : Adaptée de Antonny et al., 2016

### 3.6.3. Les hélices de dynamine se resserrent en présence de GTP

Toutes les études expérimentales ont démontré que l'une des principales propriétés de l'hélice de la dynamine est sa capacité à se contracter en présence de GTP. *In vivo*, l'inhibition de l'activité GTPase de la dynamine par des inhibiteurs ou des mutants, favorise la formation de cous allongés ayant un

rayon de membrane d'environ 10 nm, en accord avec la taille des hélices en absence de nucléotide (Chen et al., 2004; Danino et al., 2004; Liu et al., 2013; Marks et al., 2001; Roux et al., 2010; Sweitzer and Hinshaw, 1998; Takei et al., 1995). Les tubes membranaires entourés dans l'hélice de dynamine sont plus resserrés pendant l'hydrolyse du GTP ou en présence d'analogues non hydrolysables du GTP (Chen et al., 2004; Danino et al., 2004; Mears et al., 2007; Sundborger and Hinshaw, 2014; Sweitzer and Hinshaw, 1998; Zhang and Hinshaw, 2001). La conformation de l'hélice la plus resserrée est observée avec le mutant K44A de la dynamine qui présente une faible affinité pour le GTP, inhibant partiellement son activité GTPase et donc de fission. Ainsi, avec des concentrations en GTP super saturantes, la dynamine K44A peut être piégée soit dans un état lié au GTP, soit dans un état de transition d'hydrolyse du GTP. Le tube de membrane enveloppé par ce mutant présente un rayon luminal interne de 3,7 nm (Figure 30) (Sundborger and Hinshaw, 2014). Cet état super-restreint est obtenu par assemblage d'une double hélice et est également observé après des réactions de courtes durées contenant de la dynamine de type sauvage et du GTP.

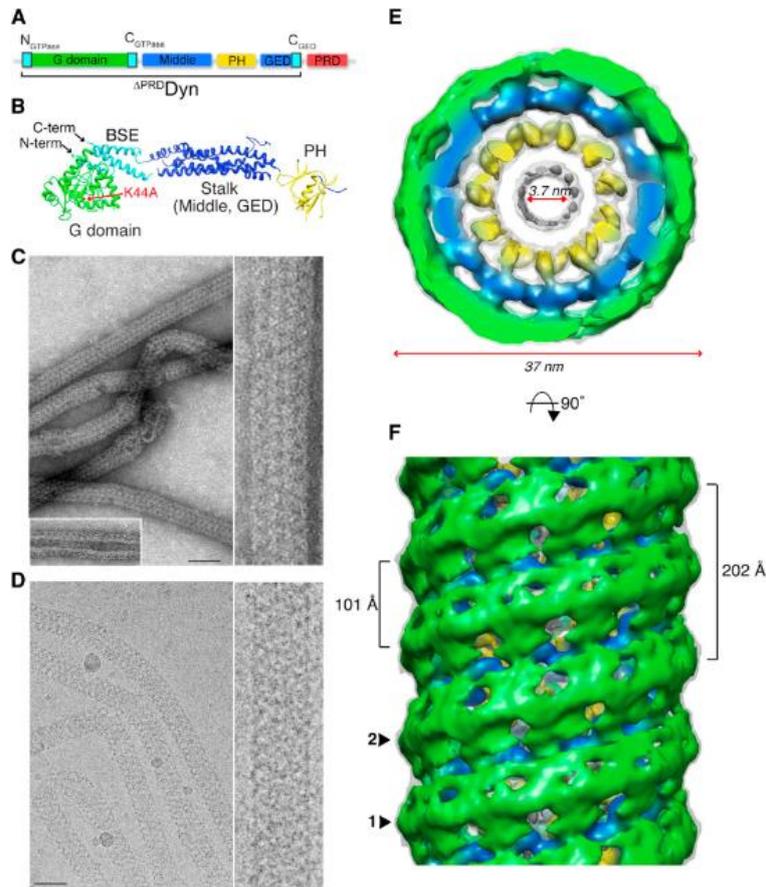


Figure 30 | Reconstruction 3D de tubules lipidiques super-resserrés  $K^{44A}Dyn_{GTP}$ .

(A) Structure de la dynamine, illustrant les domaines conservés. (B) Structure cristalline de la dynamine 1 humaine sans nucléotides (Faelber et al., 2011) montrant l'organisation de la protéine. La position de la mutation unique K44A dans le domaine G est indiquée par la flèche rouge ; les extrémités N- et C-terminales de la protéine sont indiquées. (C-D) Images de coloration négative (C) et de cryo-EM (D) de tubules recouverts de dynamine  $K^{44A}Dyn_{GTP}$  à faible (gauche) et fort (droite) grossissements. Barre d'échelle, 50 nm. (E) Vue finale de la carte de densité 3D  $K^{44A}Dyn_{GTP}$ . La carte est subdivisée en trois densités radiales colorées en vert, bleu et jaune. Le diamètre extérieur est de 37 nm et la lumière intérieure de 3.7 nm. (F) Vue de côté de la carte 3D  $K^{44A}Dyn_{GTP}$  montrant l'assemblage d'hélice à deux départs marquées 1 et 2 avec un pas hélicoïdal de 202 Å et une distance axiale entre sous-unités voisines de 101 Å.

Source : Sundborger and Hinshaw, 2014

La constriction de l'hélice de dynamine correspond à une torsion de l'hélice autour du tube membranaire qui peut être visualisée par la rotation de billes attachées aux dynamines oligomérisées dans l'hélice (Morlot et al., 2010, 2012), ou encore par observation des structures de cryo-EM qui présentent soit 14 dimères de dynamine par tour en absence de GTP (Chen et al., 2004), 13 dimères avec du GMPPCP (Zhang and Hinshaw, 2001) et 11 dimères avec le mutant K44A en présence de GTP (Sundborger and Hinshaw, 2014). La même activité de torsion pourrait entraîner l'allongement du pas de l'hélice dans le cas où le tube de membrane ne peut pas être resserré (Faelber et al., 2011; Lenz et al., 2008; Marks et al., 2001; Stowell et al., 1999). Dans le filament hélicoïdal, les domaines G des échelons voisins sont disposés de telle sorte que leurs sites de liaison nucléotidique sont situés en face

les uns des autres (Chappie et al., 2011a). Lors de la liaison nucléotidique, les domaines G opposés dimérisent et stimulent ainsi leur activité GTPase (Figure 26D, E). L'hydrolyse du GTP lié modifie la position du domaine G par rapport au domaine BSE et fournit l'énergie mécanique nécessaire pour contracter l'hélice et éventuellement sectionner la membrane (Figure 29 et Figure 31) (Chappie et al., 2010, 2011a). Une étude récente utilisant la technique de cryo-EM avec une résolution de 3,75 Å a permis de mettre en exergue l'organisation d'un polymère hélicoïdal de la dynamine 1 humaine liée au GMPPCP (analogue non hydrolysable du GTP), mettant en évidence le pliage du domaine BSE sous l'effet des forces générées par l'interaction des dimères GTPase (dimères G-G, Figure 26E). Ces forces sont ensuite transférées à travers le domaine « tige » puis vers le domaine PH sur la membrane plasmique (Figure 31) (Kong et al., 2018).

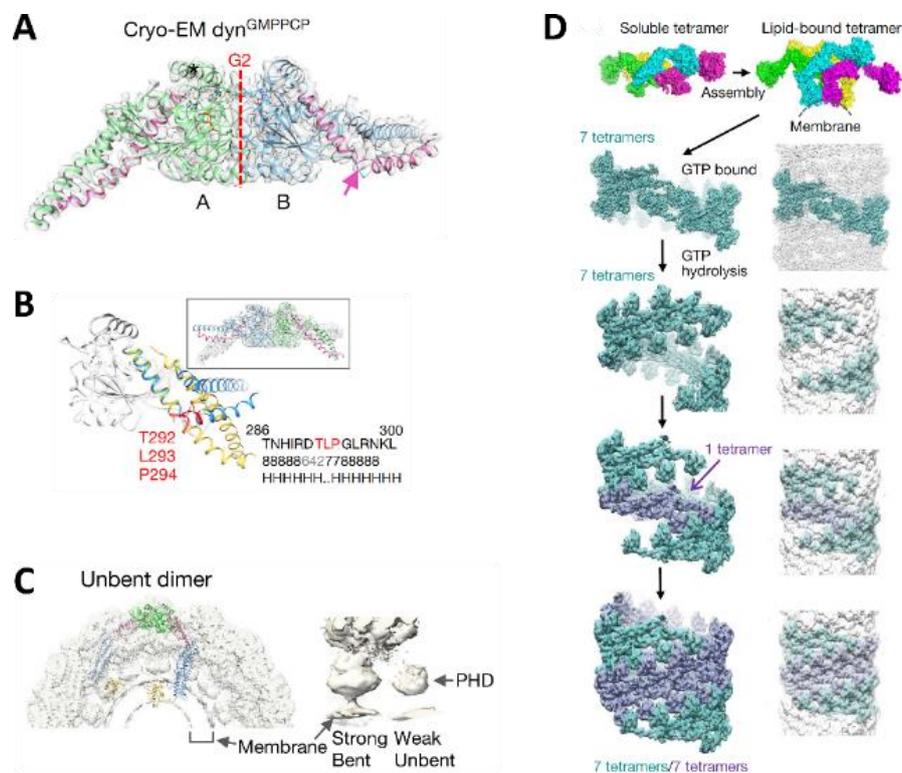


Figure 31 | Orientation du domaine BSE par rapport aux dimères des domaines GTPases et modèle d'assemblage de la dyn<sup>GTP</sup> à l'état super-resserré.

**(A)** Asymétrie des domaines GG dans le dimère dyn<sup>GMPPCP</sup> en cryo-EM révèle un coude unique (flèche rose) dans l'hélice (rose) située entre le domaine G et BSE, dans le monomère marqué B. La ligne rouge en pointillée indique l'interface G2. **(B)** Superposition des monomères A et B des domaines GG de dyn<sup>GMPPCP</sup> en cryo-EM illustre la grande asymétrie entre les domaines BSE (couleur bleue pour le domaine plié et couleur jaune pour le domaine non plié). Les acides aminés T, L et P (en rouge) sont importants pour la formation du coude de l'hélice. **(C)** Modèle d'un dimère de dynamine avec les deux domaines BSE non pliés (rose). La dynamine normalement courbée a été remplacée par une dynamine non courbée alignée sur le domaine GTPase. A droite, les domaines PH associés avec le domaine BSE coudé et non coudé se situent dans les densités les plus fortes et les plus faibles, respectivement. **(D)** Modèle d'assemblage et de rétrécissement de la dynamine. Le tétramère de dynamine s'enroule autour du tube lipidique dans un état lié au GTP sous la forme d'une seule hélice qui est interrompue par l'hydrolyse du GTP, permettant à une seconde hélice de s'assembler et de former la double hélice.

Source : Adaptée de Kong et al., 2018

### 3.6.4. Aspects biomécaniques du fonctionnement de la dynamine

Comme la plupart des données expérimentales appuient un mécanisme fondé sur la constriction (Figure 29), le débat s'est concentré sur la façon dont la constriction de l'hélice de dynamine entrainerait la scission. Néanmoins des études récentes ont apporté trois nouveaux indices importants sur la façon dont la scission membranaire pourrait se dérouler. Tout d'abord, si la membrane est suffisamment rétrécie, la scission peut se produire spontanément au bord de l'hélice de dynamine par des fluctuations de la membrane (mouvement brownien). Ce processus est activé par l'augmentation de la **tension de la membrane**. Deuxièmement, les membranes très resserrées pourraient spontanément subir une fission lorsque la couche de dynamine se désassemble lors de **l'hydrolyse du GTP**. Troisièmement, la constriction finale conduisant à une hémifission est liée à une flexion locale de la membrane induite par la **rotation des domaines d'homologie de la pleckstrine (PH)** présents dans les monomères de dynamine.

#### 3.6.4.1. Contribution de la constriction et de la tension membranaire pour la fission

Les premières observations de fission *in vitro* par la dynamine en présence de GTP ont montré que celle-ci pouvait avoir lieu uniquement **lorsque les tubules membranaires sont maintenus à leurs extrémités** (Danino et al., 2004; Roux et al., 2006a). La fission se produit en quelques minutes sans ce maintien (Dar et al., 2015a; Pucadyil and Schmid, 2008), alors qu'elle prend quelques secondes lorsque les extrémités sont maintenues (Bashkirov et al., 2008; Morlot et al., 2012; Roux et al., 2006a), montrant ainsi que la tension membranaire induite par les mouvements de rotation liés à l'hydrolyse du GTP a un impact direct sur l'efficacité de fission. Cette observation est cohérente avec le fait que l'état « super resserré » de la dynamine ne contracte pas suffisamment la membrane pour atteindre une hémifission, laissant une lumière de 3.7 nm de diamètre (Sundborger et al., 2014). De plus, lors de la constriction de la dynamine autour d'un tube membranaire, l'état hémifissionnel est atteint de façon stochastique (Mattila et al., 2015; Shnyrova et al., 2013) et est réversible, ce qui suggère qu'une fois serrée, **des fluctuations thermiques** de la membrane sont nécessaires pour atteindre cet état d'hémifission. Il a également été montré qu'une **rigidité** accrue de la membrane réduit le taux de fission (Morlot et al., 2012), et la présence de lipides polyinsaturés, qui réduisent la rigidité de la membrane, facilitent la fission (Pinot et al., 2014). L'ensemble de ces données démontrent que la constriction par la dynamine peut ne pas être suffisante pour provoquer la fission de la membrane, mais que la dynamine réduirait plutôt le tube de membrane à une taille qui atteint spontanément une hémifission en fonction de la tension et de la rigidité membranaire.

### 3.6.4.2. Désassemblage de la dynamine après hydrolyse du GTP

L'oligomérisation de la dynamine en solution a été conjointement observée avec son désassemblage lors de l'hydrolyse du GTP (Warnock et al., 1996). Ce désassemblage déclenché par le GTP a été détecté par de nombreuses techniques utilisant des tubules lipidiques (Ramachandran and Schmid, 2008; Sweitzer and Hinshaw, 1998) ou un modèle lipidique appelé SUPER (pour supported lipid bilayers with excess membrane reservoir) qui permet à la fois de visualiser les effets de la dynamine sur la bicouche lipidique adsorbée et de mesurer quantitativement la fission de la membrane par la libération de lipides marqués par fluorescence dans le surnageant. Même si ce désassemblage n'a pas toujours été rapporté (Danino et al., 2004; Morlot et al., 2012; Roux et al., 2006a; Stowell et al., 1999), un désassemblage limité ne peut pas être exclu de ces expériences. De plus, le désassemblage déclenché par le GTP est compatible avec le recyclage nécessaire de la dynamine observé *in vivo* (Cocucci et al., 2014; Doyon et al., 2011; Grassart et al., 2014; Merrifield et al., 2002). Le désassemblage est également compatible avec la découverte que la fission de la membrane se produit à l'extrémité de l'hélice de dynamine (Morlot et al., 2012) suggérant qu'une partie de l'hélice de la dynamine soit enlevée avant la fission.

### 3.6.4.3. Courbure par le domaine PH

Une étude détaillée de la structure du domaine PH a mis en évidence une boucle hydrophobe (VL1) pouvant s'insérer dans le feuillet externe de la membrane plasmique (Ramachandran and Schmid, 2008). Des mutations de cette boucle hydrophobe réduisent l'endocytose du récepteur à la transferrine *in vivo* (Ramachandran et al., 2009) indiquant un rôle de ce domaine dans la réaction de fission membranaire, et réduisent aussi la capacité de la dynamine à se lier et à tubuler la membrane. De plus, l'insertion de cette boucle hydrophobe dans le feuillet membranaire pourrait induire une courbure membranaire supplémentaire (Figure 15) lors de la constriction par la dynamine, permettant ainsi un rétrécissement plus important de la membrane en la forçant à se courber. Néanmoins, cette boucle hydrophobe ne contient que 7 acides aminés, suggérant un effet mineur de son insertion dans le feuillet membranaire pour induire une courbure, comparé à des domaines amphipathiques (ENTH ou ANTH) composés d'une quinzaine d'acides aminés et connus pour induire une courbure membranaire suite à leurs insertions. Cependant, la pression exercée par l'hélice qui se contracte peut forcer le domaine PH à s'insérer plus profondément dans le feuillet lipidique et aider à « couper » le cou des vésicules tel un « ciseau aiguisé », alors que le rétrécissement seul ne serait pas assez tranchant pour couper la membrane plasmique (Figure 32). De plus, l'étude du positionnement du domaine PH sur la membrane a conduit à une autre découverte surprenante. Des reconstructions de cryo-EM sur des tubes membranaires recouverts de dynamine à l'état contracté, ont permis de mettre

en évidence une légère inclinaison du domaine PH par rapport à l'axe perpendiculaire à la membrane (Chappie et al., 2011a; Danino et al., 2004; Mears et al., 2007). Ainsi l'ensemble de ces données suggèrent que l'inclinaison du domaine PH et sa boucle d'insertion peuvent « aiguiser le couteau » de la dynamine en déstabilisant davantage la membrane sous constriction, mais la contribution exacte de ces effets reste encore à quantifier (Figure 31A-C et Figure 32).

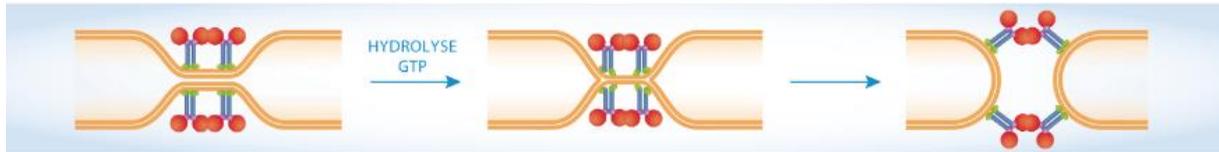


Figure 32 | L'inclinaison et l'insertion du PHD peuvent induire l'hémi-fission.

L'inclinaison du domaine PH et sa boucle d'insertion pourraient participer dans le processus de coupure membranaire lors de la constriction de l'hélice de dynamine suite à l'hydrolyse du GTP. Domaine GTPase (rouge) ; BSE (violet) ; Tige (bleu) ; PHD (vert).

Source : Adaptée de Antony et al., 2016

### 3.7. Les différents modèles de scission

Les mécanismes par lesquels la dynamine entraîne la fission membranaire ont fait l'objet d'intenses débats et ont été analysés dans des cellules vivantes (Damke et al., 1994; Lee et al., 1999; Marks et al., 2001; Stowell et al., 1999), des préparations de cellules brisées (Cao et al., 1998; Wu et al., 2010) et des systèmes minimaux à base de dynamine purifiée et de bicouches lipidiques artificielles (Bashkirov et al., 2008; Danino et al., 2004; Pucadyil and Schmid, 2008; Roux et al., 2006a; Sweitzer and Hinshaw, 1998). Les 30 années de recherches pour tenter d'élucider le mécanisme de fission de la dynamine ont abouti à la proposition de plusieurs modèles princeps (Figure 33) (Sever et al., 2000). Néanmoins l'ensemble de ces modèles ne sont pas exclusifs et l'émergence de nouveaux concepts mécanistiques (tension membranaire, désassemblage de la dynamine et implication du domaine PH) ont permis d'aboutir à deux modèles consensus qui sont encore étudiés aujourd'hui (Antony et al., 2016).

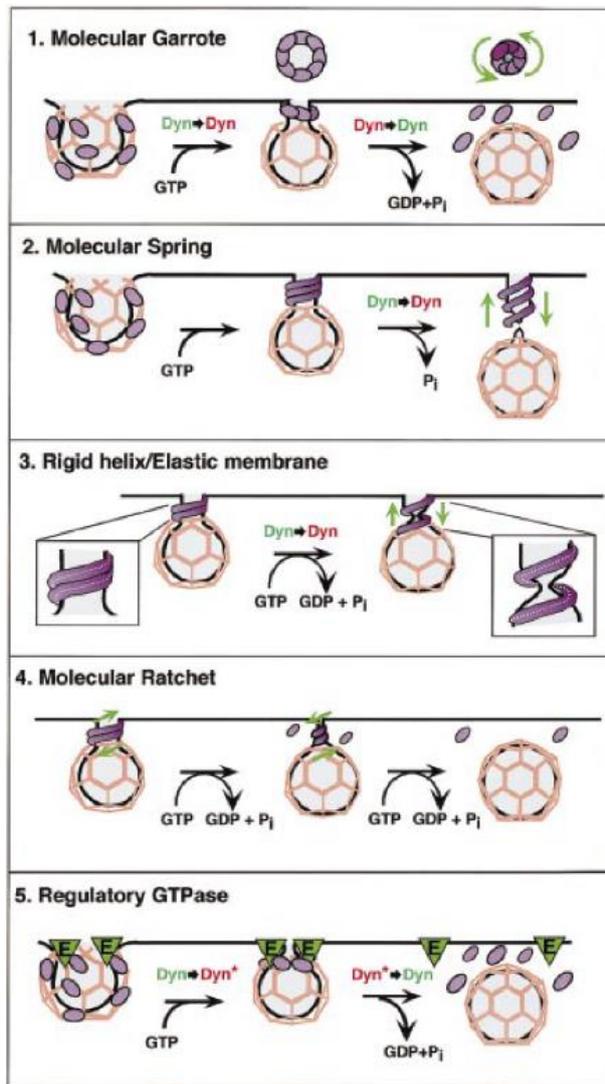


Figure 33 | Les cinq modèles princeps proposés dans la fission vésiculaire de la dynamine.

L'abréviation « Dyn » symbolise les changements de conformation de la dynamine, d'un état lié au GTP (vert) à un état lié au GDP (rouge). Pi représente le phosphate inorganique libéré après hydrolyse du GTP. Les triangles « E » symbolisent un effecteur inconnu en aval.

- Le modèle de Garrot : la dynamine change de conformation lors de l'hydrolyse du GTP pour contracter le cou de la vésicule en formation jusqu'à la fission spontanée.
- Le modèle à Cran : la dynamine se réassemble d'une hélice plus lâche à une hélice plus serrée lors de l'hydrolyse du GTP pour rétrécir le cou de la vésicule en formation jusqu'à la fission spontanée.
- Le modèle d'hélice rigide : la dynamine lie étroitement les lipides membranaires de telle sorte que le cou élastique en dessous rétrécit en même temps que le pas de l'hélice augmente lors de l'hydrolyse du GTP.
- Le modèle « Spring » : Le pas de l'hélice de dynamine augmente lors de l'hydrolyse du GTP afin de générer une force qui coupera la membrane en son point le plus fragile, c'est-à-dire où la couche de clathrine s'arrête et l'hélice de dynamine commence.
- Le modèle GTPase classique : La dynamine recrute un effecteur en aval lorsqu'elle lie le GTP, qui serait alors responsable de la fission après hydrolyse du GTP.

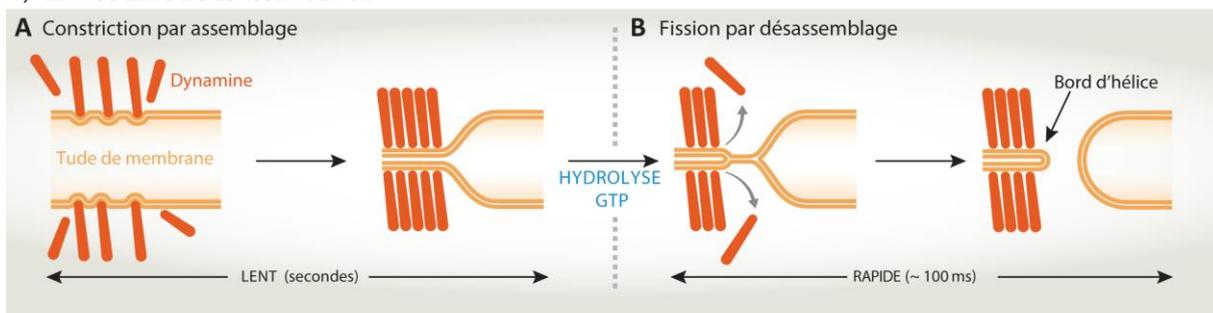
Source : Sever et al., 2000

### 3.7.1. Le modèle de désassemblage à deux étapes

Ce modèle concilie le fait que la dynamine forme une hélice qui se resserre autour de la membrane et qu'elle se désassemble lors de l'hydrolyse du GTP, en suggérant que ces deux étapes sont distinctes dans le temps (Figure 34). Ce modèle suggère qu'en premier lieu, la dynamine chargée en GTP est assemblée en hélice, adopte une conformation « très resserrée » permettant la formation d'intermédiaires d'hémifission (Figure 34A). Cette conformation « très resserrée » serait probablement adoptée lors de la transition du GTP en GDP+Pi (imité par le  $\text{GDP}\cdot\text{AlF}_4$  *in vitro*), lorsque les domaines G de chaque tour d'hélice se font face et hydrolysent le GTP en basculant (Chappie et al., 2011a) (Figure 26D, E). L'hydrolyse du GTP entraîne la libération du phosphate inorganique (Pi) et le passage de la dynamine à un état lié au GDP, déstabilisant l'hélice et entraînant la dépolymérisation de la dynamine (Figure 34B). Ceci permettrait aux intermédiaires d'hémifission de procéder à la fission

complète au bord de l'hélice en dépolymérisation (Danino et al., 2004; Mattila et al., 2015; Stowell et al., 1999). Il est important de noter que la formation de l'état de transition nécessite des interactions des domaines G entre les pas d'hélices de dynamine. En effet, les données *in vitro* (Shnyrova et al., 2013) et *in vivo* (Cocucci et al., 2014) suggèrent que l'appareil de fission minimal est légèrement supérieur à un tour d'hélice à l'état « super resserré » (25-30 monomères, 11 dimères par tour). Dans le modèle de désassemblage, la plus grande partie de l'énergie de l'hydrolyse est utilisée pour déstabiliser le polymère (comme pour la tubuline ou l'actine). Selon ce modèle à deux « états », l'assemblage de l'hélice de la dynamine et l'hydrolyse GTP rétrécissent le tube de la membrane pour permettre la formation des intermédiaires hémifission. La libération subséquente de phosphate inorganique détache l'échafaudage hélicoïdal et le désassemblage de l'hélice de la dynamine entraîne la fission complète de la membrane.

### 1) LE MODÈLE DE DÉSASSEMBLAGE



#### 3.7.1.1. Limites du modèle de désassemblage

Figure 34 | Modèle de désassemblage.

Modèle de désassemblage à deux « états » avec dans un premier temps l'assemblage de l'hélice de dynamine qui rétrécit le cou de membrane (A) puis l'hydrolyse du GTP entraîne le désassemblage de la dynamine et entraîne la fission complète de la membrane au bord de l'hélice (B).

Source : Adaptée de Antonny et al., 2016

Premièrement, le modèle de désassemblage exige que tous les dimères d'un tour d'hélice soient dans le même état nucléotidique, ce qui nécessite une coopérativité de ces dimères pour l'hydrolyse du GTP. Cela semble incompatible avec ce que l'on sait de l'activité GTPase de la dynamine. En effet le coefficient de Hill de la dynamine à l'état assemblé par rapport au GTP est de 1 (Morlot et al., 2012; Tuma and Collins, 1994), ce qui signifie qu'il n'y a pas de coopérativité des dimères dans l'hydrolyse du GTP. De plus les domaines GTPase devraient rester dans l'état de transition (GDP+Pi) assez longtemps pour qu'il y ait passage de l'état d'hémifission à fission, ce qui prendrait 5 à 10 secondes, alors que le taux d'hydrolyse du domaine GTPase dans l'état assemblé est de quelques GTP par seconde par monomère de dynamine. Ainsi la cinétique de l'hydrolyse du GTP par la dynamine semble incompatible avec le modèle de désassemblage à deux étapes. Deuxièmement, la façon dont l'hémifission est couplée au désassemblage est essentielle dans le modèle à deux étapes, car l'état « super-resserré »

de la dynamine n'atteint pas l'hémifission. L'idée est que la dépolymérisation de la dynamine est assez rapide pour déstabiliser la membrane et entraîner l'hémifission. Cependant, la membrane est très fluide, avec un temps *viscoélastique*<sup>1</sup> inférieur à 10 millisecondes (Camley and Brown, 2011). Or le taux de dépolymérisation de la dynamine est généralement de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de millisecondes, jusqu'à quelques secondes pour un désassemblage complet *in vivo* (Cocucci et al., 2014). Cela signifie que la dépolymérisation de la dynamine est beaucoup plus lente que le temps viscoélastique de la membrane et, par conséquent, le démontage complet de la couche de dynamine entourant un tube de membrane non hémifissionné devrait entraîner l'élargissement du tube plutôt que son affaissement et sa rupture.

### 3.7.2. Le modèle de constriction/à cliquets

Dans ce modèle, la fission membranaire se produit en deux étapes. Dans un premier temps, l'hélice de la dynamine contracte le nanotube lipidique de sorte que son rayon diminue (Figure 35A). Le modèle de constriction/à cliquets est un modèle de constriction raffiné qui propose que la dynamine agisse comme un moteur du même type que la myosine. Cette étape est contrôlée par la concentration de GTP, car le GTP est la source d'énergie de la dynamine, hydrolysé par les dimères de GTPase. Dans la deuxième étape, le tube de membrane rétréci, produit une hémifusion et se brise spontanément (Figure 35B). La cinétique de cette étape dépend de l'élasticité de la membrane (Figure 35B). Ainsi l'énergie d'hydrolyse du GTP serait dépensée en travail mécanique pour faire glisser les tours adjacents de l'hélice (Figure 35). Dans ce modèle, les domaines GTPase, qui relient les tours de la dynamine par des interactions directes, pourraient agir comme des moteurs moléculaires, et par des cycles d'association/powerstroke/dissociation alimentés par plusieurs cycles d'hydrolyse du GTP, provoqueraient un glissement relatif du tour hélicoïdal, entraînant une constriction et une torsion de l'hélice (Figure 35A). Ce modèle est analogue au mécanisme du mouvement de la myosine sur les filaments d'actine, mais avec la dynamine jouant le rôle de la myosine et de l'actine en même temps (Figure 35C). Dans le modèle de constriction, la majeure partie de l'énergie est utilisée pour fournir le travail mécanique nécessaire au glissement des tours hélicoïdaux et au rétrécissement, comme pour la myosine, et l'état super resserré est atteint par de multiples cycles d'hydrolyse du GTP. Dans le modèle de constriction à cliquet, les domaines G agissent comme des moteurs moléculaires qui

---

<sup>1</sup> **Viscoélasticité** : La viscoélasticité est la propriété de matériaux qui présentent des caractéristiques à la fois visqueuses et élastiques, lorsqu'ils subissent une déformation. Ici, la membrane plasmique présente une viscoélasticité inférieure à 10 millisecondes donc toute déformation se produisant plus lentement que ce temps serait suivi en douceur par une déformation de la membrane plasmique sans sa rupture.

déclenchent le glissement des tours hélicoïdaux qui entraînent la constriction et la torsion de l'hélice de la dynamine (Figure 35C), ce qui entraîne finalement la fission de la membrane (Figure 35B).

## 2) LE MODÈLE DE CONSTRICTION

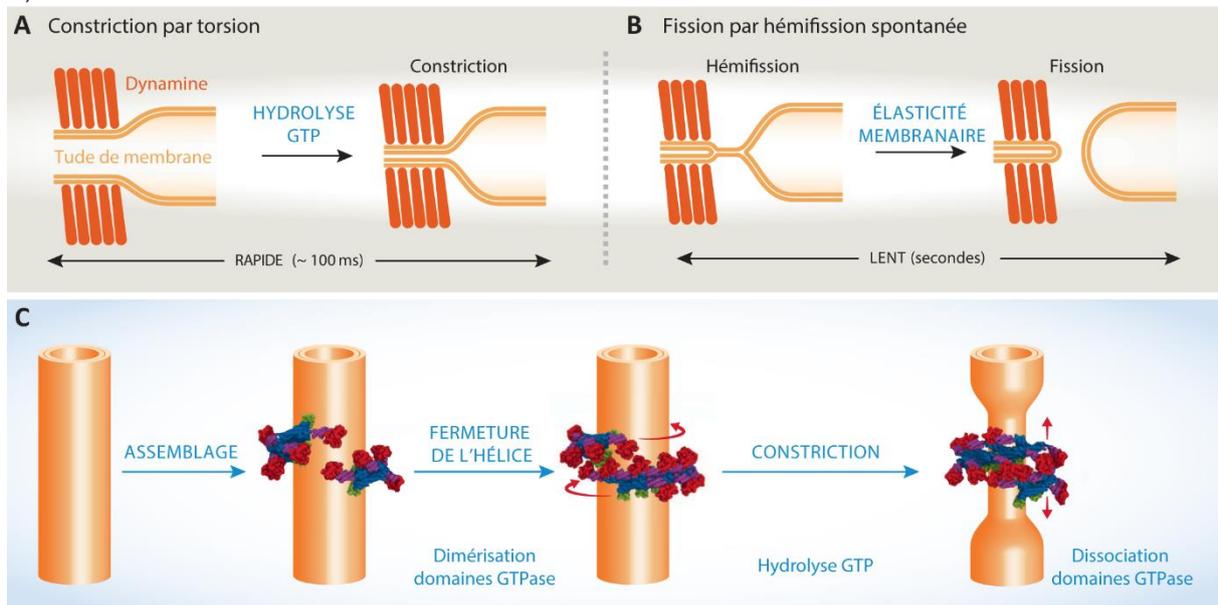


Figure 35 | Modèle de constriction.

Modèle de constriction ou à cliquets dans lequel le rétrécissement est réalisé par le glissement des tours de l'hélice par hydrolyse du GTP (A), permettant le passage spontané de l'état d'hémi-fission à la fission complète (B). Le modèle d'anneau unique présenté ici est proposé comme étant le plus courant *in vivo*, ainsi le glissement des tours d'hélice resserre la membrane jusqu'à la scission (C). Domaine GTPase (rouge) ; BSE (violet) ; Tige (bleu) ; PHD (vert).

Source : Adaptée de Antonny et al., 2016

### 3.7.2.1. Limites du modèle de constriction

Une des limites de ce modèle est que l'état « super resserré » de la dynamine n'a que 11 dimères par tour d'hélice (Sundborger et al., 2014). Cependant, dans cet état « super resserré », la dynamine forme une hélice à deux départs, il y a deux départs d'hélice parallèles qui s'enroulent autour du tubule membranaire, ce qui résulte à une double hélice par tour. La pertinence de l'hélice à deux départs et sa relation avec le mécanisme de constriction de la dynamine est actuellement en discussion (Kong et al., 2018). Un autre problème est le couplage entre la formation des dimères des domaines GTPases à l'interface G2 (Figure 26D, E) et la constriction. En effet pour permettre le glissement des têtes GTPases, les domaines G-G (Figure 26D, E) doivent être perturbés de façon transitoire, si une partie des domaines G-G est inactive dans l'hydrolyse alors que d'autres sont actifs (en mouvement) alors il n'y aura pas possibilité de glissement des têtes GTPases. Enfin dans ce modèle, la façon dont la dépolymérisation de la dynamine s'effectue est moins claire. La dépolymérisation de la dynamine serait une conséquence de la fission et/ou du rétrécissement, et l'énergie d'hydrolyse du GTP serait

principalement utilisée pour générer la force de rétrécissement. Ainsi l'hypothèse suggérée est qu'une fois que la scission est survenue, la dynamine pourrait se désassembler parce que le tubule de membrane sous-jacent s'est rétracté suite à sa scission, faisant disparaître le tubule membranaire.

### 3.8. Inhibition de la dynamine

Etant donné le caractère central de la dynamine dans la fission membranaire, de nombreuses techniques ont été utilisées afin de décoder le fonctionnement de la dynamine depuis plusieurs années. Deux approches différentes permettent de comprendre le rôle et le fonctionnement d'une protéine : **1) la délétion** ou **2) la perturbation**. La première approche repose sur des manipulations génétiques ciblées tandis que la seconde utilise des modulateurs perturbateurs exogènes.

La première approche qui repose sur la **délétion** (knock-out) ou la diminution d'expression (knock-down) d'un gène sont des technologies bien établies qui, respectivement, suppriment définitivement un gène du génome ou le réduisent au silence de façon transitoire. Ces approches empêchent l'expression de la protéine cible qui sera ainsi dans l'impossibilité d'accomplir son action. Cependant, la suppression de certains gènes peut être mortelle pour l'organisme. En effet, chez la souris, certaines études montrent que la délétion de la dynamine 2 (dynamine 2 KO) est létale à un stade précoce embryonnaire (Ferguson et al., 2009) ; ou encore que la double délétion de la dynamine 1 et 3 (DKO) entraîne une durée de vie de quelques heures, un dysfonctionnement de la transmission synaptique et des défauts de trafic aux synapses (Lou et al., 2012; Raimondi et al., 2011). A l'inverse, d'autres études n'ont observé aucun effet délétère en raison de la grande capacité des systèmes biologiques à compenser une perte fonctionnelle ce qui est notamment le cas lors de la délétion de la dynamine 3 qui n'entraîne aucun défaut neurologique ou de fertilité masculine évidents chez les souris (Raimondi et al., 2011). De plus, même lorsqu'un phénotype peut être observé, celui-ci peut être issu d'un nouvel équilibre dans le système cellulaire perturbé, limitant ainsi l'évaluation réelle de l'impact de la suppression du gène d'intérêt. Même si ces limites peuvent rendre l'interprétation des résultats difficiles, ce type d'approche a permis de démontrer l'importance des isoformes de la dynamine dans l'endocytose des vésicules synaptiques (Raimondi et al., 2011).

La seconde approche repose sur l'utilisation de **bloqueurs moléculaires exogènes** afin de « désactiver » la fonction d'une protéine de manière aiguë dans un organisme. Les effets de la perturbation aiguë peuvent être suivis de différentes manières avec l'avantage de pouvoir comparer les caractéristiques du phénomène d'intérêt avant et après la perturbation. En effet, si le mode d'action du bloqueur moléculaire est suffisamment rapide, il peut être appliqué au cours d'une

expérience et montrer des effets mesurables en quelques minutes ou secondes. Ces inhibiteurs peuvent également permettre des effets graduels en fonction de la dose et, idéalement, avoir une action réversible.

Les molécules exogènes présentant de telles activités se déclinent en deux types : les **petites molécules inhibitrices** et les **peptides biomimétiques**.

### 3.8.1. Les petites molécules inhibitrices

De nombreux modulateurs de la fonction de la dynamine ont été développés et utilisés au cours de ces 10 dernières années pour élucider les mécanismes moléculaires de l'action de la dynamine (Hill et al., 2009; Macia et al., 2006; McMahon and Boucrot, 2011; Newton et al., 2006). Ces petites molécules inhibitrices se réfèrent à des composés organiques de faible poids moléculaire qui ont souvent la capacité de traverser les membranes biologiques et dont les effets sont généralement réversibles (Macia et al., 2006; Quan et al., 2007). Cependant il est important de noter que l'utilisation de ces inhibiteurs de petites molécules comporte des risques puisque ceux-ci peuvent manquer de spécificité. Ces composés ciblent différents domaines de la dynamine (Tableau 2).

Inhibiteurs	Classe	Domaine cible	IC <sub>50</sub> in vivo
<b>Quinodyn-49</b>	Quinodins	GTPase	200 ± 47 µM
<b>Naphthaladyn-29</b>	Naphthaladins	GTPase	66 µM
<b>Dynasore</b>	Hydroxyphenyl hydrazones	Non renseignée	~ 15 µM
<b>Rhodadyn-D10</b>	Rhodadins	GTPase	5,9 ± 1 µM
<b>Dyngo-4a</b>	Hydroxyphenyl hydrazones	Non renseignée	5,7 ± 1 µM
<b>GTPyS</b>	Nucléotide	GTPase	Non renseigné
<b>MiTMAB</b>	Sels d'ammunium d'alkyle	GTPase	20,9 ± 3,2 µM
<b>OcTMAB</b>	Sels d'ammunium d'alkyle	PH	16 ± 4,2 µM
<b>Pyrimidyn-7</b>	Pyrimidins	GTPase/PH	12,1 ± 2,1 µM

Tableau 2 | Liste non exhaustive des inhibiteurs de la dynamine et de leur domaine cible.

Les différents composés ciblent différents domaines de la dynamine et entravent ainsi sa fonction. Les inhibiteurs se liant au domaine GTPase entrent en concurrence avec la liaison au GTP et diminuent l'activité GTPase nécessaire pour la scission. Les inhibiteurs du domaine PH empêchent le recrutement de la dynamine à la membrane. D'autres n'ont pas de domaine cible défini mais peuvent inhiber l'assemblage de l'hélice de la dynamine.

Source : Adaptée de Eschenburg et Reubold, 2018

Le premier composé chimique utilisé pour inhiber de façon aiguë l'activité de la GTPase de la dynamine a été le dynasore (Macia et al., 2006). Le dynasore ainsi que le développement ultérieur de ses dérivés améliorés : DD-6, DD-10 (Lee et al., 2010) et le **dyngo-4a** (Mccluskey et al., 2013) ont depuis été largement utilisés pour démontrer l'implication de la dynamine dans divers processus comme l'entrée du virus HIV (Miyachi et al., 2009), ou la formation de l'invagination membranaire dans l'EDC (Nankoe and Sever, 2006). Bien que son domaine cible ne soit pas clairement identifié, il semblerait que le dyngo-4a ait une préférence pour l'inhibition de la dynamine oligomérisée en hélice (Mccluskey et al., 2013). Cependant, sa spécificité a été remise en question par une étude faite sur une lignée cellulaire de fibroblastes murins dont les gènes de la dynamine sont supprimés (TKO, pour triple knockout) et montrant tout de même un effet de cet inhibiteur sur l'endocytose de phase liquide et une modification des membranes périphériques (lamellipodes) (Park et al., 2013; Preta et al., 2015). Le **GTPγS** est un analogue du GTP non hydrolysable et non perméable des membranes cellulaires, se liant au domaine GTPase des protéines, les empêchant ainsi de s'activer ou de s'inactiver par hydrolyse du GTP en GDP+Pi. Ce nucléotide cible ainsi les protéines possédant une activité GTPase et ne peut donc pas être spécifique d'une protéine donnée.

Comme tous les autres outils de recherche, ces petites molécules inhibitrices sont soumises à leurs propres limites, comme une perméabilité cellulaire potentiellement faible, une cytotoxicité ou encore un risque d'action hors cible (inconnue). Une solution à ces limites est l'utilisation de différents inhibiteurs qui augmente ainsi la probabilité de révéler un processus cellulaire dépendant de la dynamine tout en réduisant la possibilité de sur-interpréter des processus qui pourraient en fait dériver d'effets hors cibles des molécules utilisées.

### 3.8.2. Les peptides biomimétiques

Le mécanisme d'endocytose dépend d'interactions protéines-protéines pour s'enclencher et se poursuivre. Il est donc possible de concurrencer ces interactions endogènes en utilisant un « appât » pouvant être un domaine protéique isolé entier ou un peptide de quelques acides aminés de long, entraînant ainsi la séquestration d'un des partenaires de l'interaction. Cette approche a été largement utilisée, notamment avec les domaines protéiques entiers SH3 de l'amphiphysine (Wigge et al., 1997) ou de l'endophiline (Gad et al., 2000) pour empêcher le recrutement de la dynamine aux sites d'endocytose. De plus petits peptides interférents dérivés du PRD de la dynamine (Shupliakov et al., 1997a) ou du PRD de la synaptojanine (Llobet et al., 2011) ont été également conçus pour empêcher le recrutement de l'amphiphysine ou de l'endophiline respectivement. Le plus efficace et le plus utilisé est le peptide mimant le domaine d'interaction avec l'amphiphysine, nommé D15 (séquence PPPQVPSRPNRAPPG) (Shupliakov et al., 1997a) qui inhibe l'endocytose des vésicules synaptiques

quand il est injecté dans la terminaison présynaptique de l'axone géant de lamproie, comme le domaine SH3 isolé de l'amphiphysine. Le peptide D15 a été utilisé surtout dans des expériences d'électrophysiologie où il peut diffuser dans le cytoplasme cellulaire par une pipette de patch-clamp (Jockusch et al., 2005; Lüscher et al., 1999; Shupliakov et al., 1997a; Yamashita et al., 2005a). Cependant, il n'est efficace qu'à forte concentration (1 mM), bien supérieure à la concentration endogène de dynamine estimée (0.5  $\mu$ M) ce qui suggère que de multiples motifs présents sur le domaine PRD stabilisent l'interaction entre la dynamine et l'amphiphysine, comme montré récemment au laboratoire (Rosendale et al., 2018).

### 3.9. Modifications post-traductionnelles

Les fonctions des dynamines sont régulées par diverses modifications post-traductionnelles qui affectent leur activité GTPase, leur multimerisation ou leur association membranaire. Récemment, plusieurs rapports ont démontré la variété de ces modifications qui permettent de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les dynamines influencent les réponses cellulaires aux différents signaux physiologiques et environnementaux. Les protéines de cette famille subissent diverses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la nitrosylation, l'ubiquitylation, la sumoylation, l'acétylation qui régulent leurs propriétés fonctionnelles, notamment le recrutement membranaire, l'auto-assemblage, l'activité GTPase et les interactions avec les partenaires protéiques (Kar et al., 2017). Par exemple, il a été mis en évidence que la déphosphorylation de la dynamine 1 permet son interaction avec la syndapin, déclenchant l'endocytose des vésicules synaptiques afin de maintenir la continuité du recyclage des vésicules synaptiques et donc le maintien de la transmission synaptique (Anggono et al., 2006). Une autre étude, inhibant de façon aiguë la kinase GSK3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3  $\beta$ ) empêche la phosphorylation de la dynamine 1, augmentant ainsi l'endocytose des récepteurs à la transferrine et le taux d'initiation des PRC avec une diminution de la durée de vie des PRC (Srinivasan et al., 2018). De plus, la perte de ces régulations manifeste plusieurs troubles physiologiques soulignant l'importance de ces modifications dans divers processus cellulaires (Bitoun et al., 2005, 2009; Durieux et al., 2010; Züchner et al., 2004, 2005).

### 3.10. Dynamine et pathologies

La dynamine est une GTPase qui joue un rôle vital dans l'endocytose dépendante de la clathrine et d'autres processus de trafic vésiculaire en agissant comme une paire de ciseaux moléculaires pour les vésicules nouvellement formées provenant de la membrane plasmique. Les dynamines et les protéines apparentées sont des composants importants pour le clivage des vésicules recouvertes de clathrine, des phagosomes et des mitochondries. Ces protéines aident à la division des organelles, à la résistance

virale et à la fusion/fission mitochondriale. La dysfonction et les mutations de la dynamine ont été impliquées dans la pathophysiologie de divers troubles (Singh et al., 2017). Les progrès de la biologie moléculaire et de l'analyse génétique ont révélé que des mutations des gènes humains des DNM1 et DNM2 sont liées à divers troubles tels que la maladie d'Alzheimer (Aidaraliev et al., 2008; Kuwano et al., 2006; Meister et al., 2014; Zhu et al., 2012), Parkinson, Huntington (Chakraborty et al., 2014; Harjes and Wanker, 2003), Charcot-Marie-Tooth (Koutsopoulos et al., 2011; Sidiropoulos et al., 2012), l'épilepsie (Boumil et al., 2010; Li et al., 2015), le cancer (Inokawa et al., 2013; Xu et al., 2014) ou encore la trisomie 21 (Clayton and Cousin, 2009; Lai et al., 1999).

### 3.11. Recrutement et fonction de la dynamine dans les cellules

La dynamine peut contribuer à de multiples formes d'endocytose (« Les différents modes d'endocytose » p39), mais son action est mieux comprise dans le contexte de l'EDC (Ferguson and De Camilli, 2012). Comme déjà mentionné à plusieurs reprises dans ce manuscrit, la dynamine est une protéine importante pour la scission vésiculaire, c'est-à-dire pour la transition d'une fosse invaginée à la membrane plasmique en une vésicule intracellulaire nouvellement formée. Le mécanisme par lequel la dynamine réalise cette tâche a été et est toujours un sujet très discuté. Plusieurs modèles ont été proposés, chacun avec ses preuves expérimentales et ses limites. Les techniques *in vitro* utilisées pour l'analyse du fonctionnement et de l'organisation de la dynamine présentent certaines limitations. En effet, l'utilisation de cellules fixées en microscopie électronique ou cryo-EM ne permet pas d'analyser la dynamique de la dynamine ou des PRC individuels, car on ne dispose, pour chaque cellule ou structure marquée, que d'un intervalle entre le marquage et la fixation (Mattila et al., 2015; Sundborger et al., 2014). De même, les études réalisées sur des tubules lipidiques (Bashkirov et al., 2008; Danino et al., 2004; Dar et al., 2015b; Morlot et al., 2012; Pucadyil and Schmid, 2008; Roux et al., 2006b) se limitent à l'étude de la dynamine en condition isolée, purifiée, occultant l'ensemble des interactions protéiques que la dynamine peut avoir dans des systèmes plus physiologiques *in vivo*. Hors l'EDC implique l'interaction de multiples protéines qui sont recrutées et libérées de façon séquentielle à partir des PRC bourgeonnant à la membrane plasmique. Des études décrivant le profil de recrutement *in vivo* de la dynamine au niveau de structures recouvertes de clathrine (SRC) dans l'EDC ont été réalisées (Figure 36A). Le suivi de la formation et de la disparition des SRC par microscopie TIRF a permis de mettre en évidence le profil de recrutement tardif de la dynamine, avec une diminution conjointe de la fluorescence de la clathrine et de la dynamine (Merrifield et al., 2002). Néanmoins le postulat de la correspondance entre disparition de la clathrine et scission n'est pas toujours correct selon le système utilisé (voir « Visualisation de la dynamique de la clathrine » p63). C'est ainsi que le couplage entre la technique du ppH et la microscopie TIRF a été mise au point afin de déterminer

directement, avec une résolution temporelle de deux secondes, le moment de formation d'une vésicule à la membrane (Perrais and Merrifield, 2005). Ainsi sur des centaines d'évènements d'endocytose, il a été frappant de constater que le pic de fluorescence de la dynamine au moment de la scission est décalé de celui observé lorsque la référence utilisée est la disparition de la clathrine (Figure 36G, H). La dynamine est recrutée de façon transitoire en deux étapes séquentielles, au début de la formation de la vésicule (-80 et -20 secondes avant la scission « 0 ») et juste avant la scission avec un pic de recrutement rapide (- 4 secondes avant la scission) (Figure 36H) (Taylor et al., 2011).

Des mutants du domaine GTPase ont également été étudiés en cellules vivantes avec le protocole de ppH (Taylor et al., 2012). Le mutant T65A de la dynamine 1 présente une inhibition modérée de l'EDC et montre un profil de recrutement plus lent avant la scission, comparé à la dynamine 1 contrôle (Figure 36D). L'étude morphologique des PRC dans les cellules exprimant ce mutant ont montré une augmentation des PRC en forme d'oméga et tubulés (Figure 36E-F). Un autre mutant, le K44A de la dynamine 1 présente une inhibition totale de l'endocytose (Kural et al., 2012b; Sundborger et al., 2014; Taylor et al., 2012) et montre une forte augmentation des PRC tubulés à la membrane plasmique (Figure 36F). Ainsi ces expériences ont mis en évidence le rôle de l'activité GTPase dans la maturation des PRC (Taylor et al., 2012).

Ainsi grâce à cette technique de nombreux profils de recrutement d'autres protéines interagissant notamment avec la dynamine ont pu être étudiés (Figure 36D-F). En effet, l'amphiphysine et l'endophiline sont des protéines N-BAR, qui agissent en synergie pour le recrutement de la dynamine au PRC et la scission vésiculaire (Meinecke et al., 2013). Ces deux protéines sont recrutées de façon rapide et juste avant la scission vésiculaire pour ensuite être rapidement libérées après la scission (Figure 36F). De même, le recrutement de l'actine, connue pour avoir un rôle dans la formation des vésicules d'endocytose (Boucrot et al., 2006; Gottlieb et al., 1993), présente un profil de recrutement conjoint avec la dynamine (Figure 36E). La connaissance du profil de recrutement d'une protéine défini précisément par rapport à un événement cellulaire, comme ici la scission membranaire, constitue une avancée importante dans la compréhension de ce phénomène. Cependant, la présence d'une protéine ne nous renseigne pas totalement sur son rôle. L'observation la plus précise possible d'un phénomène est certes essentielle, mais il faut pouvoir déterminer les liens de causalité en perturbant le phénomène.

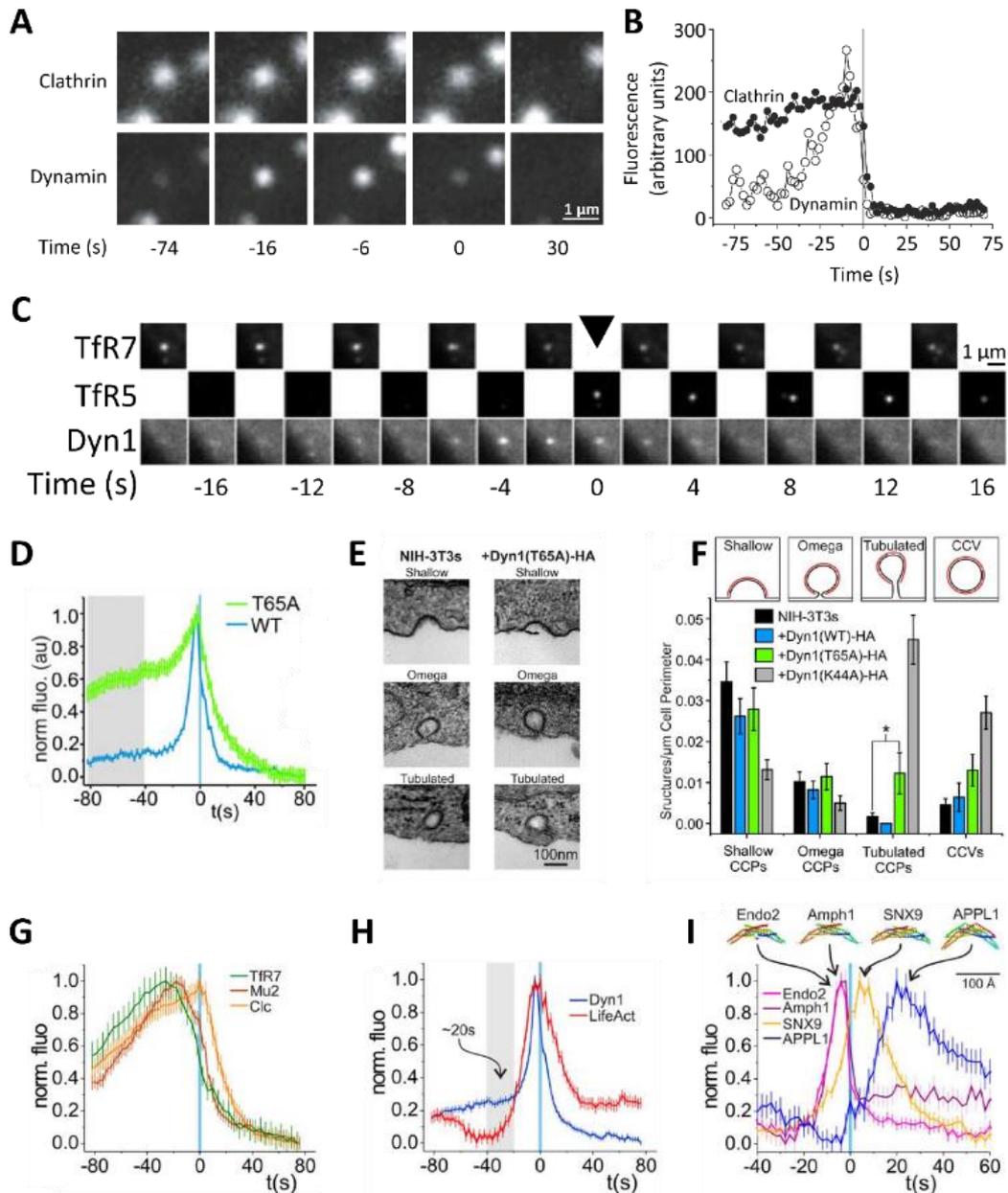


Figure 36 | Profil de recrutement de la dynamine.

(A) Image d'épifluorescence d'une structure recouverte de clathrine (haut) et de dynamine (bas). La disparition de la fluorescence de clathrine est précédée d'un recrutement transitoire de la dynamine. (B) Mesure de fluorescence de la clathrine (●) et de la dynamine (○) en fonction du temps. (C) Exemple d'évènement de scission. Au temps 0, une vésicule recouverte de clathrine a été détectée sur l'image à pH 5 (pointe de flèche noire). La dynamine 1 a été recrutée de façon transitoire, avec un pic à -4 secondes. (D) Comparaison du profil de recrutement de la dynamine contrôlée (WT) et de la dynamine mutée dans son domaine GTPase (par remplacement de la 65<sup>ème</sup> thréonine en alanine, dyn1(T65A)). (E) Analyse ultra structurale par microscopie électronique des PRC dans des cellules contrôles et des cellules exprimant le mutant dyn1(T65A). La forme des PRC observés est soit peu profond, en forme d'oméga ou tubulée. (F) Analyse morphométrique de la fréquence des profils des PRC dans des cellules exprimant la dynamine 1 contrôlée (dyn1(WT)) et des mutants du domaine GTPase. (G-I) Profil de recrutement de plusieurs protéines : Récepteur à la Transferrine (TfR7), AP-2 (Mu2), Clathrine (Clc), Dynamine 1 (Dyn1), Actine (LifeAct), Endophiline (Endo), Amphiphysine (Amph1), Sorting nexin-9 (SNX9), Adaptor protein phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1 (APPL1).

Source : Adaptées de (A-B) Merrifield et al., 2002 ; (C, G-I) Taylor et al., 2011 ; (D-F) Taylor et al., 2012

# Objectifs de la thèse

Comme décrit dans l'introduction, de nombreuses études se sont intéressées au mécanisme de scission vésiculaire par la dynamine, notamment pour comprendre l'organisation supramoléculaire de cette protéine ainsi que le rôle de chacun de ses domaines.

De nombreux modèles ont été proposés, démontrant l'assemblage de la dynamine en hélice autour du cou des vésicules pour effectuer la scission par hydrolyse du GTP pendant l'endocytose. Bien que ces études aient permis d'apporter des informations sur son rôle, elles possèdent également leurs limites selon les approches utilisées. Les systèmes reconstitués *in vitro* (Bashkirov et al., 2008; Danino et al., 2004; Dar et al., 2015b; Liu et al., 2009; Mattila et al., 2015; Pucadyil and Schmid, 2008; Ramachandran and Schmid, 2008; Reubold et al., 2015b; Roux et al., 2006a; Sundborger et al., 2014; Sweitzer and Hinshaw, 1998) ne permettent qu'une vision finale de l'arrangement des molécules de dynamine en hélice, tandis que les observations sur cellules fixées (Ferguson et al., 2009; Koenig and Ikeda, 1989; Takei et al., 1995) ne permettent pas d'observer la dynamique de la dynamine au cours de la formation vésiculaire. Les études sur les cellules vivantes n'ont pour l'instant décrit que le recrutement global de la dynamine aux PRC, ce qui ne permet pas de déduire les paramètres microscopiques de recrutement des molécules individuelles.

L'objectif de cette thèse a été ainsi d'élucider la dynamique de recrutement et d'action de la dynamine aux PRC pendant la formation des vésicules d'endocytose dans des cellules vivantes à l'échelle de molécules individuelles.

Pour parvenir à cet objectif, j'ai utilisé le protocole de ppH permettant la visualisation de la formation vésiculaire dans les cellules vivantes avec une résolution spatio-temporelle élevée. Ce protocole ppH permet d'étudier le profil de recrutement des protéines impliquées dans l'endocytose, notamment la dynamine, tout au long de la formation des PRC. En effet, cette technique a mis en évidence que la dynamine est recrutée de façon transitoire aux PRC juste avant la scission vésiculaire (Merrifield et al., 2005; Taylor et al., 2011). Afin de déterminer si les molécules de dynamines recrutées sont piégées aux PRC, j'ai réalisé des expériences de FRAP. Pour étudier plus finement le comportement diffusif des molécules de dynamine à la membrane plasmique en fonction du stade de formation des PRC j'ai donc couplé le protocole de ppH à une technique super-résolutive telle que le single-particle tracking photoactivated localization microscopy (sptPALM). Enfin j'ai utilisé ces techniques en combinaison avec des mutations des domaines PH et PRD de la dynamine afin de mieux comprendre leur rôle dans la diffusion à la membrane plasmique et la scission vésiculaire.



# Matériels et Méthodes

## 1. Mise en œuvre expérimentale

### 1.1. Cultures cellulaires

#### 1.1.1. Fibroblaste 3T3

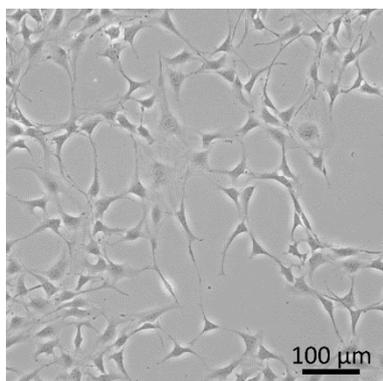


Figure 37 | Cellules NIH-3T3 en culture.

Une partie des expériences a été réalisée avec des fibroblastes embryonnaires de souris suisses albinos immortalisés (NIH-3T3, pour Swiss Albinos « 3-day transfer, inoculum  $3 \times 10^5$  cells »), provenant de l'European Collection of Authenticated Cell Cultures (NIH-3T3D4, ECACC 85111801) (Figure 37). Cette lignée a été utilisée précédemment dans l'équipe pour l'étude de la dynamique moléculaire de l'EDC, et notamment dans le développement du protocole de pH (Perrais and Merrifield, 2005; Shen et al., 2014; Taylor et al., 2011). Ces cellules ont l'avantage d'adhérer facilement

à un substrat de verre recouvert de poly-L-lysine. Elles développent de grands lamellipodes plats permettant l'observation d'une grande surface membranaire au contact des lamelles de verre, facilitant ainsi l'observation par microscopie TIRF des événements d'endocytose à la membrane mais restent suffisamment bombées pour être facilement enregistrées par la technique de patch-clamp (voir « La dialyse cellulaire et l'enregistrement patch-clamp » p109).

#### 1.1.2. MEF triple knock-out dynamine

Une partie des expériences a été menée avec des fibroblastes embryonnaires murins immortalisés (MEF, pour mouse embryonic fibroblasts) dont les 3 gènes (DNM1-3) de la dynamine (dynamine-1, dynamine-2 et dynamine-3) peuvent être délétés par application d'hydroxytamoxifène. Cette lignée est appelée TKO dynamine (Figure 38). Cette lignée nous a été fournie par P. De Camilli (Yale School of Medicine, New Haven, CT) qui a produit cette lignée. Cette lignée fut utilisée précédemment dans l'équipe pour étudier l'effet de différents mutants de la dynamine dans l'EDC.

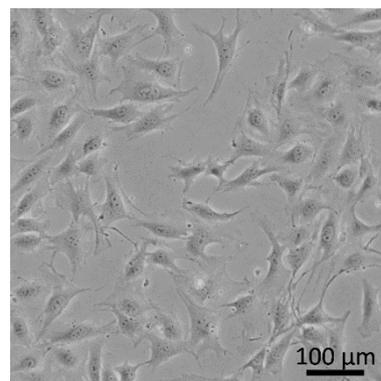


Figure 38 | Cellules MEF en culture.

### 1.1.3. Maintenance

Les cellules NIH-3T3 et MEF TKO dynamine sont cultivées en milieu DMEM *high glucose* (Gibco, CM1DME60K-BP), sauf pour les expériences de sptPALM où le milieu utilisé est du Fluorobrite (Gibco, A1896701) pour éviter l'autofluorescence dû au rouge phénol. Chacun des milieux est complété avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Eurobio, CVFSVF00-01), 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco, 11360070), 2 mM de Glutamax (Gibco, 35050038) et 100 U/ml de pénicilline/streptomycine (Gibco, 15140122). Les cellules ont été incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à utilisation. A confluence, les cellules étaient détachées par une solution de trypsine à 0.05%-0.02% EDTA (Gibco, 25300054) après retrait du milieu usagé et 1 rinçage au PBS 1X (Euromedex, ET330) pour retirer toutes traces de sérum contenu dans le milieu. Après 1 à 3 minutes dans la trypsine, les cellules décollées étaient remises en contact avec du milieu complété contenant du sérum pour permettre l'inactivation de la trypsine, puis centrifugées 5 minutes à 700 RCF. Le surnageant était ensuite retiré, les cellules resuspendues dans du milieu complété etensemencées dans une nouvelle boîte de culture. Les NIH-3T3 étaient passées tous les 2-4 jours pour leur maintien du fait de leur division rapide, à l'inverse les MEF TKO dynamine étaient passées une fois par semaine.

## 1.2. Constructions moléculaires et transfection

La construction du récepteur à la transferrine couplé à la phluorine super-ecliptique (TfR-SEP) (homme, vecteur : pcDNAHygro (+), promoteur : CMV) nous a été donnée par Christophe Mulle (IINS, Bordeaux) (Merrifield et al., 2005). Les constructions Dynamine1-mCherry (souris, vecteur : Clontech N1, promoteur : CMV) et Dynamine1-GFP (pour *green fluorescent protein*) (souris, vecteur : Clontech N1, promoteur : CMV) nous ont été données par Christien Merrifield (Taylor et al., 2011). La construction Dynamine2-mCherry (homme, vecteur : Clontech N1, promoteur : CMV) a été obtenue par amplification PCR (réaction en chaîne par polymérase) de la séquence de la Dynamine2 et insérée dans le plasmide Clontech N1 aux sites BglII/XhoI. La construction mEos3.2 N1 a été obtenue par remplacement de la séquence mCherry par la séquence mEos3.2 dans le plasmide Clontech N1 par insertion aux sites AgeI/NotI. La construction Dynamine1-mEos3.2 (souris, vecteur : Clontech N1, promoteur : CMV) a été obtenue à partir du vecteur pmEos3.2 N1 créé en remplaçant mCherry par mEos3.2 dans pmCherry N1 par AgeI/NotI, puis par insertion en phase de la séquence de la Dynamine1 aux sites EcoRI/AgeI. La construction Dynamine1-ΔPH-mEos3.2 (souris, vecteur : Clontech N1, promoteur : CMV) a été créée à partir du gène muté de la dynamine 1 commandé chez Eurofins. Ce gène contenait 6 histidines en remplacement du domaine PH (Dar and Pucadyil, 2017), il a ensuite été inséré par sous-clonage avec les sites BlnI/ApaI. La construction Dynamine1-ΔPH-ΔPRD-mEos3.2 (souris, vecteur : Clontech N1, promoteur : CMV) a été obtenue en supprimant le domaine

PRD par amplification PCR (réaction en chaîne par polymérase) de la Dynamine1 sans le domaine PRD et sous-clonage de ce fragment dans le plasmide Dynamine1- $\Delta$ PH-mEos3.2 aux sites BspEI/AgeI. La construction Dynamine1- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (souris, vecteur : Clontech N1, promoteur : CMV) a été obtenue à partir du plasmide Dynamine1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD-mEos3.2, par insertion du fragment non délété de Dynamine1 aux sites BspEI/KpnI. La construction clathrine-GFP (vecteur : pEGFP-N1, promoteur : CMV) nous a été donnée par Dr. A. Echard (Institut Pasteur, Paris). Toutes les constructions ont été contrôlées par séquençage auprès de la compagnie Eurofins.

Les cellules NIH-3T3 ont été transfectées transitoirement avec 1.5  $\mu$ g à 3  $\mu$ g d'ADN de plasmide 24h avant imagerie et patch clamp, en utilisant le Fugene 6 (Promega) comme réactif de transfection. Les transfections ont été effectuées conformément aux recommandations des fabricants. 4 à 8 heures après la transfection, les cellules ont étéensemencées à une densité de  $\approx 70\,000$  cellules.ml<sup>-1</sup> sur des lamelles de verre de 18 mm recouvertes de poly-L-lysine (3 minutes d'application de 0.1 mM de poly-L-lysine (Sigma P2636) dans un tampon borate de pH 8.4, suivi d'un rinçage rapide au PBS) et utilisées le lendemain.

Les cellules MEF triple knock-out dynamine ont été induites par application de 3  $\mu$ M d'hydroxytamoxifène (OHT, Sigma) pendant 2 jours, puis de 0.3  $\mu$ M pendant 4 jours supplémentaires avant transfection. Les cellules ont ensuite été transfectées transitoirement par nucléoporation avec le kit MEF 1 Amaxa avec le programme MEF T020 (Lonza, Suisse) en mélangeant 0,5-3  $\mu$ g d'ADN avec 10<sup>6</sup> cellules. Après nucléoporation, les cellules ont étéensemencées à une densité de  $\approx 100\,000$  cellules.ml<sup>-1</sup> sur des lamelles de verre de 18 mm dans du milieu de culture équilibré. Les cellules MEF TKO dynamine ont mieux adhéré sans revêtement de poly-L-lysine. Un intérêt particulier a été porté sur la sélection des cellules NIH-3T3 et des cellules MEF TKO dynamine entre un signal fluorescent suffisant pour l'acquisition et une surexpression raisonnable pour diminuer les artefacts potentiels de saturation de surexpression.

## 2. Approches - Principes et intérêts

### 2.1. Microscopie de fluorescence par réflexion interne totale (TIRF)

La réflexion interne totale est un phénomène physique qui se produit lorsqu'une onde lumineuse arrive à l'interface entre deux milieux ayant des indices de réfraction différents ( $n_1 > n_2$ ). Lorsque l'angle d'incidence  $\Theta_1$  est supérieur à la valeur de l'angle critique  $\Theta_c$ , la lumière est totalement réfléchie sans être réfractée : on a réflexion interne totale, ou total internal reflection (TIR) en anglais (Figure 39). En dessous de cet angle, la lumière se propage dans le milieu d'indice  $n_2$  avec un angle de  $\Theta_2$ .

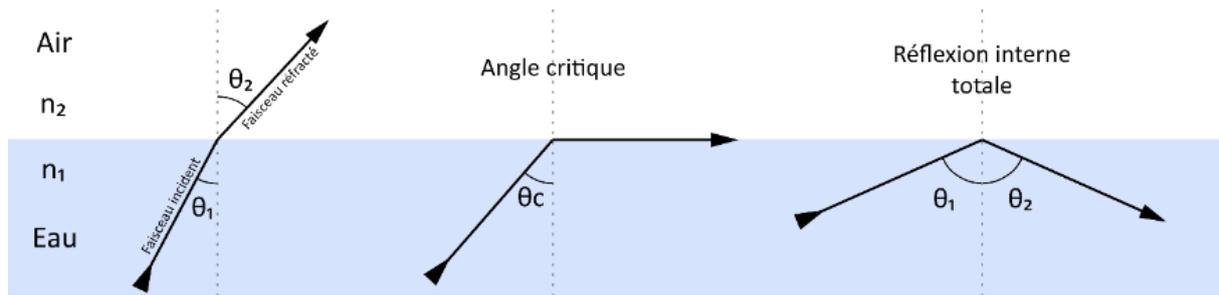


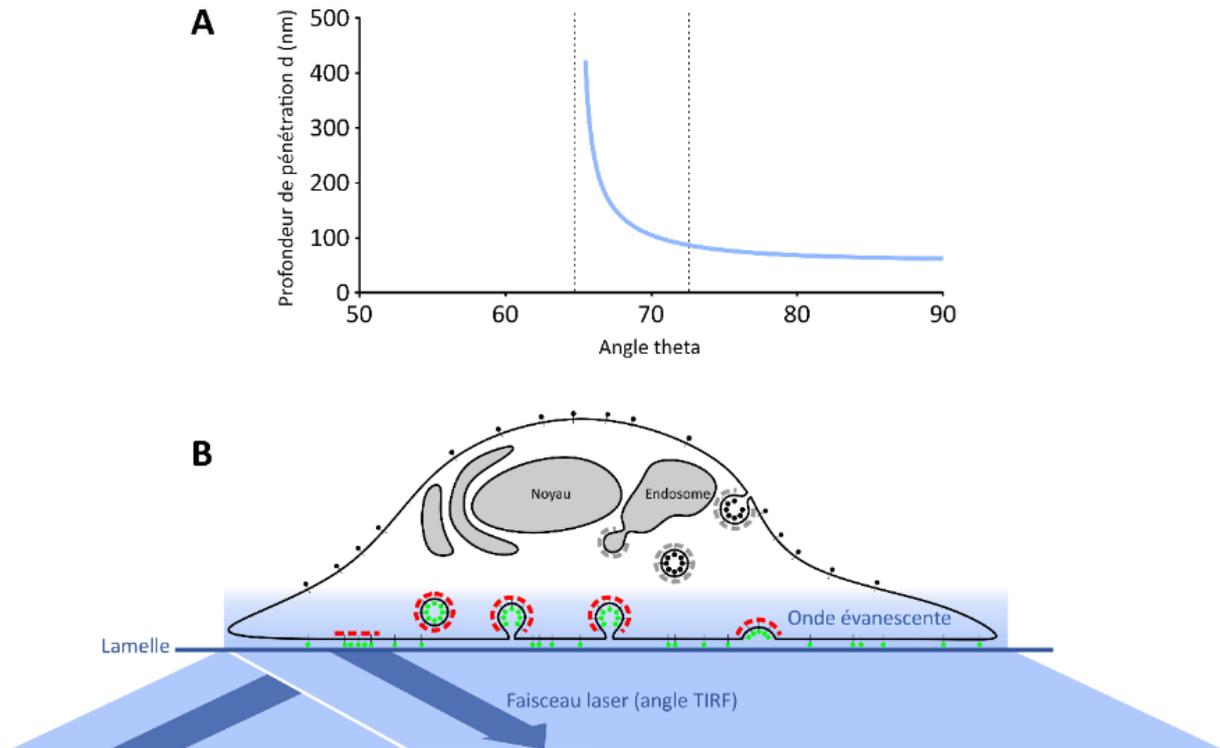
Figure 39 | Définition de l'angle d'incidence critique.

Selon la loi de Snell-Descartes :  $n_1 \cdot \sin(\theta_1) = n_2 \cdot \sin(\theta_2)$  ; où  $n_1$  et  $n_2$  sont les indices de réfraction respectifs des milieux 1 et 2 tel que  $n_1 > n_2$ , et  $\theta_1$  et  $\theta_2$  les angles formés par les rayons incident et réfracté. La réflexion interne totale est obtenue pour un angle supérieur à celui de l'angle critique tel que :  $\theta_c = \arcsin(n_2/n_1)$ .

Dans le cas d'une TIR, une onde évanescente est créée à l'interface dans le deuxième milieu. Cette onde a la particularité de se dissiper rapidement à mesure que la distance par rapport à l'interface augmente selon une fonction exponentielle avec une longueur caractéristique  $d$ . Pour une onde plane monochromatique la valeur de  $d$  dépend de la longueur d'onde  $\lambda$  de la lumière incidente, de  $n_1$ ,  $n_2$  et  $\theta_1$  selon la formule :

$$d = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{(n_1 \sin\theta_1)^2 - n_2^2}}$$

Pour produire une illumination TIRF, j'ai utilisé deux objectifs Olympus 100x d'ouverture numérique 1.49 et 150x d'ouverture numérique 1.45 (UAPON150XOTIRF/1.45). Comme l'ouverture numérique représente la valeur maximale de l'angle d'incidence  $\theta_1$  multiplié par l'indice  $n_1$  (1.52 dans le cas du verre utilisé pour les lamelles), on a au minimum  $d \sim 100$  nm (Figure 40A). Ainsi cette onde évanescente appliquée en microscopie à fluorescence, permet d'obtenir l'illumination d'une partie de la cellule située entre 100 et 200 nm de la surface de la lamelle de verre qui représente la surface des cellules en culture dans le milieu aqueux adhérente à la lamelle (Figure 40B).



## 2.2. Le protocole d'échange de pH extracellulaire – Le protocole ppH

### 2.2.1. La genèse du protocole ppH

Le protocole de pH pulsé (ppH) a été développé il y a presque 15 ans (Perrais and Merrifield, 2005) pour l'étude de l'endocytose dans les lignées cellulaires et s'est révélé être une technique très efficace pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des vésicules d'EDC (Taylor et al., 2011). Principalement cité par la communauté scientifique pour sa résolution temporelle inégalée, le ppH a également apporté la preuve que les vésicules recouvertes de clathrine peuvent internaliser des cargos sans modification majeure du signal de clathrine lui-même. Cette capacité de visualiser et d'analyser la formation de vésicules d'endocytose directement, en distinguant le cargo internalisé et le cargo resté sur la membrane plasmique plutôt que de visualiser la dynamique des plaques de clathrine, en fait une solution de choix pour caractériser sans ambiguïté la dynamique de formation des vésicules d'EDC. Le principe fondamental du protocole ppH est d'isoler de nouveaux signaux

fluorescents intracellulaires de la fluorescence extracellulaire globale en échangeant toutes les 2 secondes la solution extracellulaire tout en synchronisant l'acquisition d'images. Le protocole ppH schématisé dans la Figure 41 est basé sur l'échange alterné du pH de la solution extracellulaire dans laquelle les cellules se trouvent. Ce changement s'effectue toutes les deux secondes entre deux solutions extracellulaires à pH 5,5 et 7,4. Les cellules expriment le récepteur à la transferrine couplé à la phluorine super-écliptique (en vert lorsqu'il est fluorescent et en noir lorsqu'il est « éteint » par l'acidité, Figure 41). La phluorine super-écliptique (SEP) est une protéine fluorescente dérivée de la GFP (pour *green fluorescent protein*) sensible au pH. En effet à pH acide (5,5), la SEP est 20 fois moins fluorescente qu'à pH physiologique (7,4). De plus, la SEP est encodée génétiquement, permettant ainsi sa fusion aux protéines d'intérêt. Sa sensibilité au pH et son encodage génétique en font un outil précieux pour l'analyse de la dynamique des protéines associées au trafic vésiculaire d'exocytose et d'endocytose (Sankaranarayanan et al., 2000). A pH 7,4, le Tfr-SEP est visible à la membrane plasmique et dans les vésicules recouvertes de clathrine non acides (en rouge sur la Figure 41). A pH 5,5, seule la fluorescence des vésicules recouvertes de clathrine non acides est visible. Ainsi une vésicule formée à pH 7,4 sera visible sur l'image suivante à pH 5,5 (Figure 41).

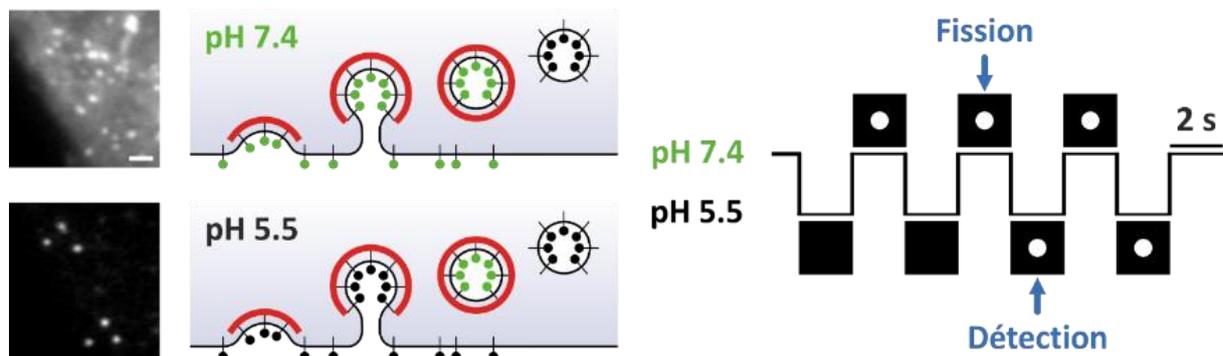


Figure 41 | Représentation du protocole ppH.

Schéma du principe expérimental d'échange de solutions extracellulaires toutes les deux secondes (panel de droite). Une cellule exprimant la clathrine-DsRed (rouge) et le Tfr-SEP (sucettes vertes, fluorescentes ; sucettes noires, non fluorescentes) est alternativement baignée dans des solutions à pH 7,4 et pH 5,5. Au pH 7,4, le Tfr-SEP est visible sur la membrane plasmique et dans les vésicules recouvertes de clathrine non acides (panel du haut). Une vésicule recouverte de clathrine formée à pH 7,4 sera visible sur l'image suivante à pH 5,5 tant qu'elle ne sera pas réacidifiée (panel du bas). Barre d'échelle, 1  $\mu\text{m}$ .

De nombreux contrôles comme décrit dans (Taylor et al., 2011), ont été réalisés pour s'assurer de la fiabilité du protocole ppH : (i) la fréquence d'apparition des PRC ne varie pas pendant la totalité de la période d'imagerie (jusqu'à vingt minutes), (ii) le pH cytoplasmique ne diminue que de 0.2 unité pH en 15 minutes, ce qui n'affecte pas l'EDC, (iii) la morphologie des PRC, visualisée par microscopie électronique, n'est pas affectée par ce protocole, (iv) l'application de solution à pH acide n'évoque pas

de courant dans les cellules enregistrées par la méthode de patch clamp, (v) la transferrine marquée est internalisée et transportée dans les endosomes de recyclage pendant le protocole.

Une partie de mon travail de thèse a consisté à utiliser ce protocole ppH pour la visualisation de la formation de vésicules d'EDC et de le combiner à une autre technique de microscopie à haute résolution qui est le sptPALM afin de pouvoir suivre en temps réelle la dynamique de molécules uniques impliquées dans la scission de ces vésicules d'endocytose.

### 2.2.2. Description du poste et de l'acquisition

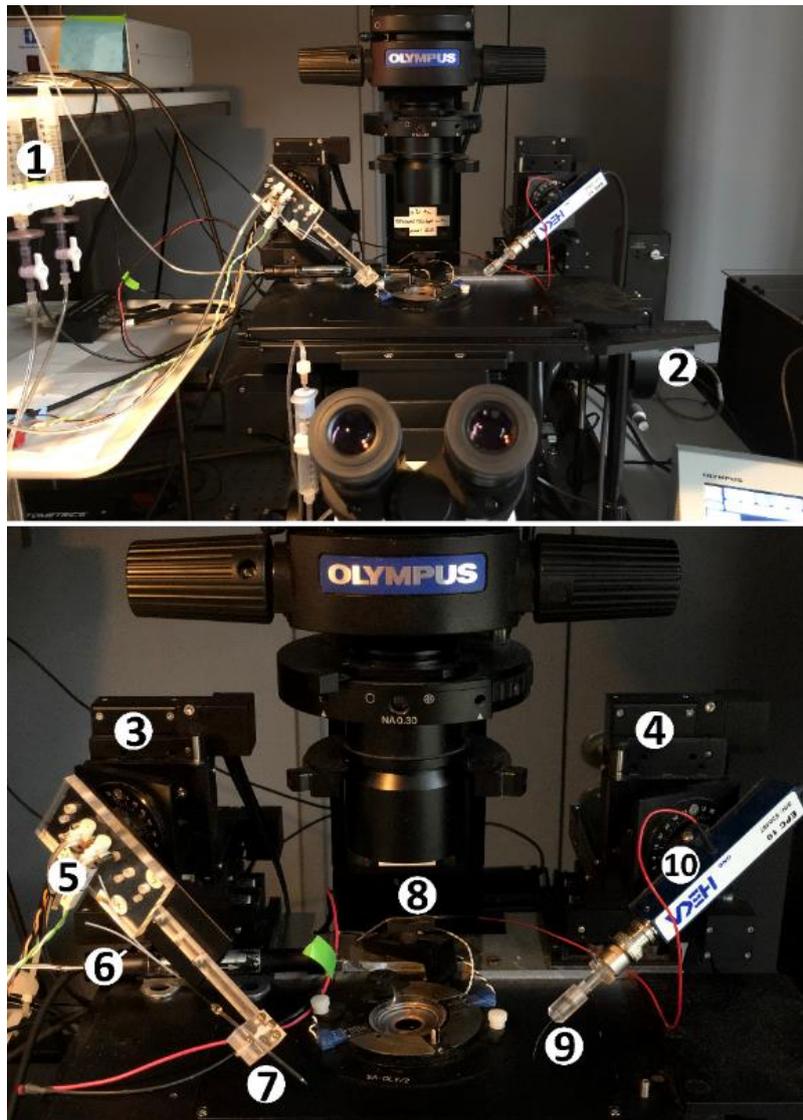


Figure 42 | Poste d'imagerie utilisé pour l'imagerie TIRF et le patch-clamp.

**(Haut)** 1 : Seringues contenant les solutions à pH 7,4 et 5,5 ; 2 : Bras TIRF. **(Bas)** 3 et 4 : Micromanipulateurs ; 5 : Valves électriques ; 6 : Système de chauffage de la solution de perfusion ; 7 : Pipette d'application ; 8 : Electrode de référence ; 9 : Pipette de patch contenant l'électrode d'enregistrement ; 10 : Préamplificateur.

J'ai utilisé pour mes expériences deux postes d'imagerie TIRF équipés de pipettes de perfusion pour le protocole ppH que je vais décrire dans ce paragraphe. J'ai également utilisé un microscope confocale « spinning disk » pour l'acquisition d'images de cellules fixées, de la plate-forme d'imagerie photonique du BIC (Bordeaux Imaging Center).

Le premier poste d'imagerie est constitué d'un microscope inversé (IX83, Olympus) équipé d'un objectif à huile Apochromat N 100x (ouverture numérique : 1,49) muni d'un système d'auto-focalisation (ZDC). Les images ont été acquises à l'aide d'une caméra EMCCD (QuantEM:512SC, Roper Scientific) contrôlée par MetaVue7.1 (Roper Scientific). Les lamelles présentant les échantillons cellulaires sont montées dans une chambre Warner QE-1 (Harvard Apparatus) perfusée d'une solution extracellulaire chauffée à l'aide d'un dispositif de chauffage à 37°C (Figure 42). La solution extracellulaire excédentaire est aspirée et jetée par une pompe à vide.

#### 2.2.2.1. Trajet optique

Les cellules ont été excitées avec une source laser. Les fluorophores émettant dans le vert, tels que la GFP et la SEP, ont été excités par un laser de longueur d'onde de 473 nm. Les fluorophores émettant dans le rouge tels que mCherry, DsRed ont été excités par un laser de longueur d'onde de 561 nm. Afin de réduire au minimum la phototoxicité, un obturateur commandé par ordinateur a été placé sur le trajet du laser d'excitation afin de ne s'ouvrir que lorsque la caméra fait une acquisition. Le laser d'excitation pénètre une fibre optique par l'intermédiaire d'un dispositif de couplage qui dirige le faisceau dans le bras TIRF du microscope. Le faisceau traverse ensuite une série de miroirs, de lentilles et l'objectif pour enfin obtenir une réflexion totale interne de ce faisceau sur la lamelle de verre. La lumière émise est renvoyée dans l'objectif et passe à travers un miroir dichroïque à double bande passante permissive aux UV (ZT405/473/561, Chroma Technology Corp.). Avant d'atteindre la caméra, un système Dual View (Roper Scientific) peut être inséré pour la visualisation de deux couleurs en simultanée. Ce système de double-vue permet de diviser le faisceau des lumières émises en vert (filtre d'émission ET525/50m) et en rouge (filtre d'émission ET605/52m), et de les visualiser simultanément mais séparément sur la même puce de caméra (Figure 43).

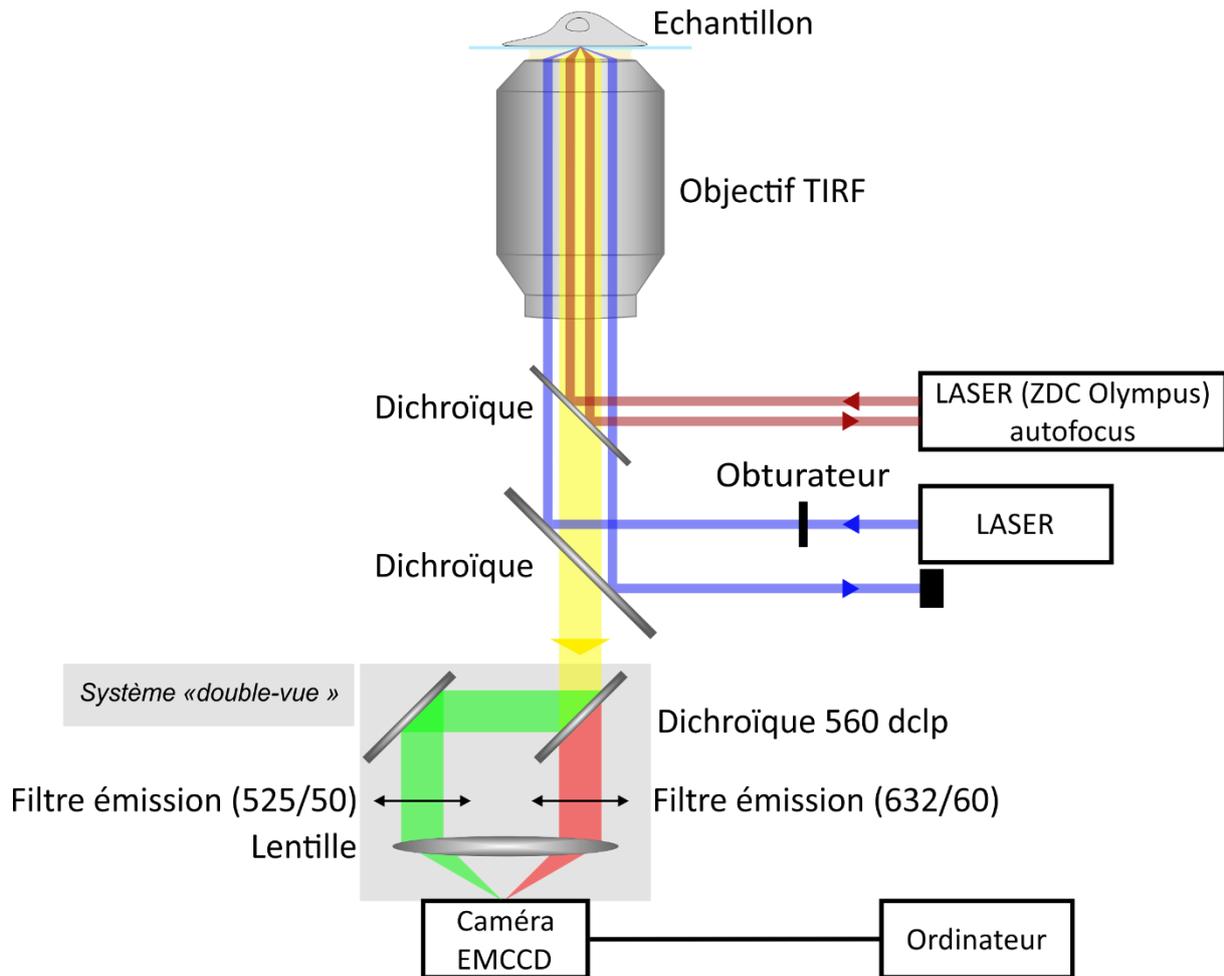


Figure 43 | Schéma du trajet optique du microscope TIRF.

#### 2.2.2.2. Utilisation de « gâchettes »

Afin de coordonner l'acquisition d'images, l'échange rapide de solutions extracellulaires et les enregistrements d'électrophysiologie, j'ai utilisé un système de déclenchement (gâchette), contrôlé par le logiciel « Pulse » (Heka). Ce système repose sur l'utilisation de signaux Transistor-Transistor Logic (TTL) qui définissent les états d'ouverture et de fermeture des différents composants du système en tant que signaux d'entrée-sortie. Le protocole est constitué d'une succession de séquences de 4 secondes déclenchée par l'ouverture de la caméra. Les différentes commandes qui découlent de ce déclencheur sont illustrées dans la Figure 44.

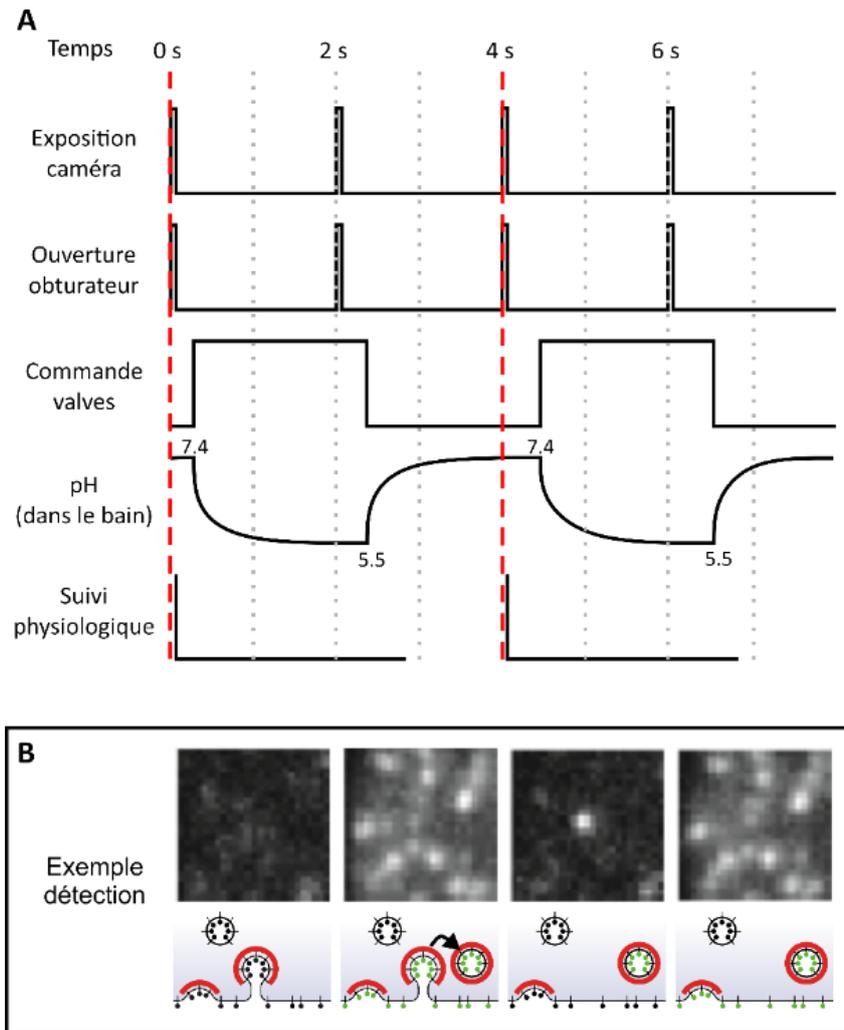


Figure 44 | Représentation du système de « gâchettes ».

**(A)** L'acquisition d'images par la caméra déclenche l'ouverture de l'obturateur, ce qui permet d'éclairer l'échantillon pendant 100 ms. La fermeture de l'obturateur enverra à son tour une commande à l'amplificateur de patch contrôlé par le logiciel « Pulse », qui, 100 ms plus tard, mettra en marche (1) les électrovannes responsables de l'échange de solution rapide ; (2) enregistrera une trace électrophysiologique pendant 2,5 secondes en mode « voltage clamp ». **(B)** Le protocole ppH permet la détection, dans les images acquises à pH 5,5, d'évènements de scission de vésicules qui se sont détachées de la membrane plasmique dans l'intervalle précédent de 2 secondes à pH 7,4.

### 2.2.2.3. Echange rapide de solution extracellulaire

L'échange rapide du milieu extracellulaire autour de la cellule est obtenu par une pipette en verre thêta (Figure 45) placée près de la cellule à enregistrer. Le premier canal contient l'HBS (pH 7,4) et le deuxième le MBS (pH 5,5) (Tableau 3). Ces pipettes d'application ont été fabriquées par nos soins à partir de capillaires en verre borosilicaté (GC150F, Harvard Apparatus) afin d'obtenir une section de  $\approx 100 \mu\text{m}$  à leur extrémité en utilisant une étireuse verticale Narishige (World Precision Instruments). A l'autre extrémité, chaque côté de la pipette thêta est relié à des électrovannes à trois voies (Lee

Company, 5 V DC) à l'aide de filaments de quartz (World Precision Instruments) et de tubes en plastique (Figure 42). De la colle époxy a été utilisée pour sceller l'extrémité de la pipette afin d'empêcher l'air de pénétrer dans les canaux. Les électrovannes ont été connectées à des seringues de 10 ml contenant les solutions d'HBS et de MBS et contrôlées par l'amplificateur de patch comme décrit ci-dessus. Les expériences utilisant l'inhibiteur dyngo-4a ont été réalisées en ajoutant directement l'inhibiteur aux solutions d'HBS et de MBS dans la pipette par la deuxième entrée des vannes trois voies.

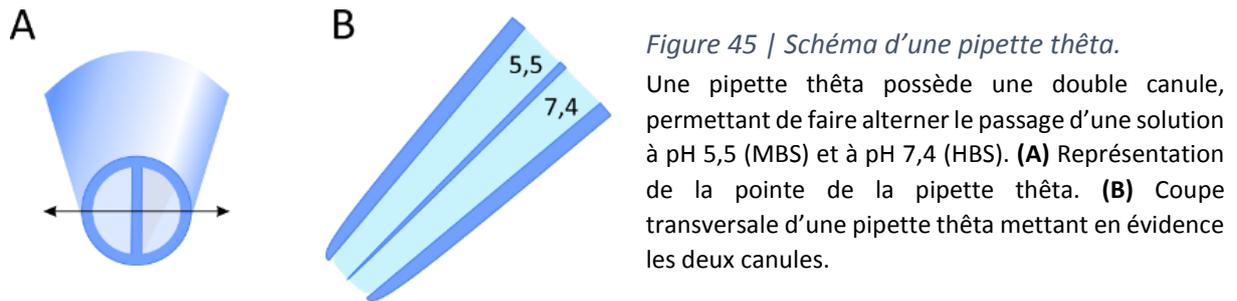


Tableau 3 | Composition des solutions extracellulaires.

Le pH de chaque solution est ensuite ajusté à 5,5 et 7,4 à l'aide d'une solution de NaOH. Si besoin de l'eau ou du NaCl a été ajouté à la solution finale pour ajuster l'osmolarité à  $\approx 300-315$  mOsm/L.

	NaCl	KCl	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	Glucose	HEPES	MBS	pH
HBS	135 mM	5 mM	1,8 mM	0,4 mM	1 mM	20 mM		7,4
MBS	135 mM	5 mM	1,8 mM	0,4 mM	1 mM		20 mM	5,5
Fournisseur	Sigma Aldrich							

#### 2.2.2.4. La dialyse cellulaire et l'enregistrement patch-clamp

Les expériences utilisant des inhibiteurs de l'endocytose non perméables aux membranes cellulaires (tel que le GTP $\gamma$ S) ont été dialysés dans les cellules à l'aide d'une pipette de patch.

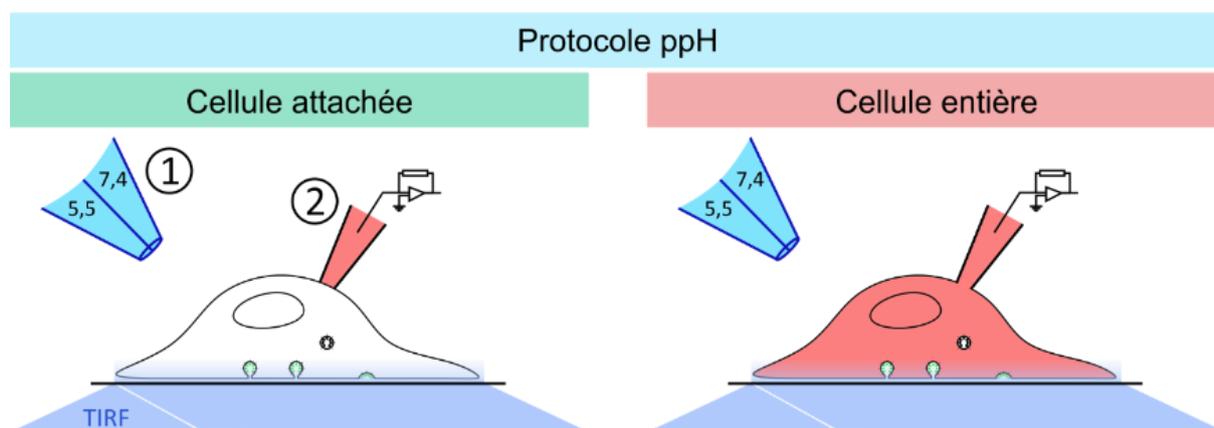


Figure 46 | Imagerie et dialyse cellulaire simultanées.

Les cellules NIH-3T3 sont transfectées pendant 24h avec le Tfr-SEP et imagées avec le protocole pH sous une illumination TIRF. **(1)** Pipette d'application permettant l'échange de pH extracellulaire. **(2)** Pipette de patch permettant la dialyse de la cellule avec une solution intracellulaire. Au cours de l'expérience, l'activité d'endocytose de base de la cellule est enregistrée avec la pipette de patch en configuration « cellule attachée » (l'orifice de la pipette est scellé sur la membrane cellulaire intacte). Dans cette configuration, la cellule n'est globalement pas perturbée. Après un enregistrement de 5 minutes de l'activité d'endocytose de la cellule, le *patch* membranaire de la pipette est rompu par une légère aspiration pour passer dans une configuration « cellule entière », permettant à la solution contenue dans la pipette de patch d'entrer en contact avec le milieu intracellulaire, et de dialyser l'inhibiteur. Les paramètres physiologiques sont enregistrés et surveillés en simultanément afin d'attester de la viabilité cellulaire et de la qualité du patch.

#### 2.2.2.5. Surveillance électrique

Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés en maintenant la cellule *patchée* à un potentiel de maintien constant de -60 mV et en mesurant les variations de courant se produisant à travers la membrane plasmique. Ces variations ont été mesurées entre une électrode de référence en argent placée dans le bain (Figure 42, n°7) et l'électrode d'enregistrement (Figure 42, n°8). Lorsque la cellule était en configuration « cellule entière », l'électrode de la pipette de patch remplie d'une solution intracellulaire, était en contact direct avec l'intérieur de la cellule. L'étireuse verticale (Narishige, World Precision Instruments) utilisée pour obtenir ces pipettes de patch, a été ajustée pour que la résistance de la pipette seule en solution soit inférieure à 5 MΩ. L'électrode de référence était maintenue par un préamplificateur (Figure 42, n°10) qui à son tour était connecté à l'amplificateur principal (Heka) contrôlé par le logiciel Pulse et centralisant le système de déclenchement.

#### 2.2.2.6. Solution intracellulaire

La solution intracellulaire utilisée pour la dialyse des inhibiteurs non perméables aux membranes devait imiter étroitement la composition du cytoplasme pour maintenir l'intégrité de la cellule. Le potassium fut utilisé comme cation majeur de cette solution intracellulaire (Carpentier et al., 1989). La composition de la solution intracellulaire utilisée pour les expériences de dialyse cellulaire était 120

mM de  $\text{KCH}_3\text{SO}_3$ , 1 mM de BAPTA (un chélateur d'ions calcium), 4mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM d'HEPES et 3 mM de Na-L-Ascorbate ayant un effet antioxydant pouvant aider à obtenir une plus grande stabilité pour les expériences d'imagerie de longue durée. Le pH a été ajusté à 7,2 à l'aide de KOH. Si besoin de l'eau ou du  $\text{KCH}_3\text{SO}_3$  a été ajouté à la solution finale pour ajuster l'osmolarité à  $\approx 300\text{-}305$  mOsm/L. Le jour de l'expérience, des nucléotides sont ajoutés à cette solution pour atteindre 4 mM de  $\text{Na}_x\text{ATP}$  et 0,4 mM de  $\text{Na}_x\text{GTP}$  dans la solution finale. De plus, afin de maintenir une réserve disponible de phosphate pour la régénération de l'ATP, 5 mM de  $\text{Na}_2\text{Phosphocréatine}$  ont été ajoutés extemporanément. Ces compléments ont été conservés concentrés à 50x dans des aliquotes à usage unique conservés à  $-20^\circ\text{C}$ . Après l'addition des nucléotides, la solution intracellulaire a été conservée sur de la glace pendant toute la durée de l'expérience. Pour évaluer l'effet d'un blocage de l'endocytose une même cellule est enregistrée avec le protocole ppH tout d'abord en configuration « cellule attachée » pendant 5 minutes pour déterminer une activité d'endocytose. Puis on passe en « cellule entière » pour comparer l'activité après la dialyse de la cellule par la solution intracellulaire. Pour chaque expérience, des cellules contrôles ont été enregistrées en début et fin d'expérience. Si la mesure de l'activité d'endocytose sur ces cellules était stable alors les données obtenues en présence du bloqueur GTPyS étaient gardées. Si ces cellules contrôles ne présentaient pas une activité d'endocytose stable, alors les données obtenues ce jour-là n'étaient pas prises en compte.

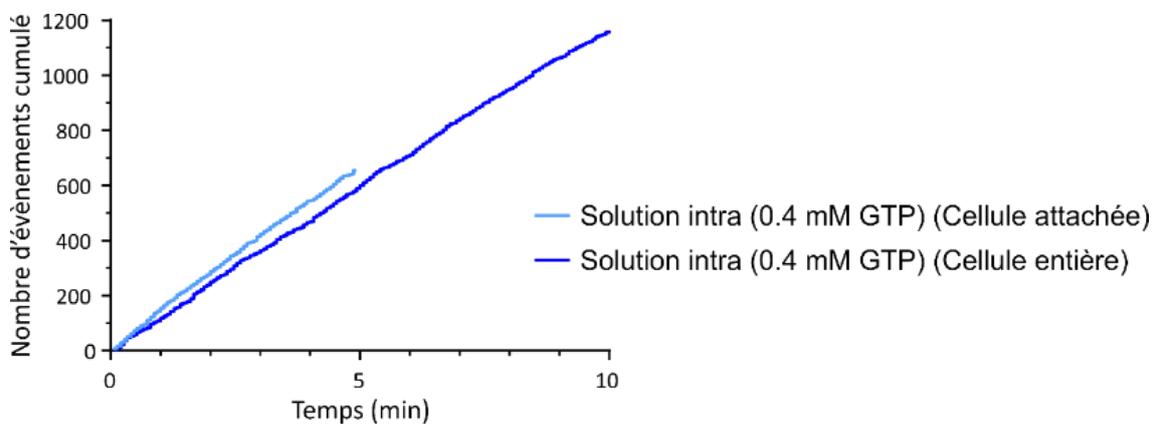


Figure 47 | Mesure de la fréquence d'endocytose en configuration « cellule attachée » puis en configuration « cellule entière ».

Le nombre d'événements d'endocytose cumulés est obtenu après analyse des enregistrements utilisant le protocole de ppH, en fonction du temps. Une ligne droite représente une activité d'endocytose stable pendant les 5 min et 10 minutes d'enregistrement en configuration « cellule attachée » et « cellule entière » respectivement (tracés bleus). L'arrêt de la formation de nouvelles vésicules d'endocytose serait représenté par la formation d'un plateau horizontal.

### 2.2.2.7. Surveillance des paramètres cellulaires

Lors de la dialyse des cellules NIH-3T3, trois paramètres ont été surveillés tout au long de chaque enregistrement afin de s'assurer que l'expérience elle-même n'induisait pas la mort cellulaire et que la dialyse cellulaire était effectuée efficacement. Une impulsion test est envoyée toutes les 4 secondes pour vérifier certains paramètres de la cellule comme la capacité membranaire ( $C_m$ ), la résistance en série ( $R_s$ ) et le courant de fuite ( $C_f$ ). Si l'un ou l'autre des paramètres ne respectait pas une certaine valeur au cours de l'expérience, alors l'enregistrement n'était pas considéré comme utilisable.

- **$C_m$**  (pour capacité membranaire) est directement proportionnelle à la surface membranaire de la cellule et est utilisée pour l'étude d'exocytose et d'endocytose (Neher and Marty, 1982). Ainsi nous avons surveillé tout au long de l'expérience que la valeur de  $C_m$  ne variait pas de façon drastique, ce qui aurait indiqué un rétrécissement ou un gonflement membranaire lié à la mort cellulaire.
- **$R_s$**  (pour résistance en série) est directement proportionnelle au flux d'ions à travers la pipette de patch. Si la pipette de patch est obstruée, par de la membrane si le patch commence à se refermer, alors  $R_s$  augmentera. Nous avons choisi empiriquement  $10\text{ M}\Omega$  comme valeur maximale de  $R_s$  de façon à assurer une dialyse correcte de la solution intracellulaire contenue dans la pipette de patch à l'intérieur de la cellule.
- **$C_f$**  (pour courant de fuite) reflète la qualité du sceau entre la pipette de patch et la membrane cellulaire. Dans la configuration « cellule attachée », le sceau était étanche et le  $C_f$  était aux alentours de  $-10\text{ pA}$ . Lors du changement de configuration de la pipette de patch en « cellule entière », cette valeur pouvait varier. De plus, il a été observé que lorsque cette valeur fluctuait au cours de l'enregistrement en « cellule entière », l'endocytose avait tendance à se dégrader, même en absence d'inhibiteur. Nous avons déterminé une valeur minimale de  $C_f$  de  $-100\text{ pA}$  au-delà de laquelle les enregistrements n'étaient pas pris en compte. Néanmoins, ce critère n'a pas été suivi pour les expériences utilisant le GTP $\gamma$ S en tant qu'inhibiteur de l'endocytose car le blocage de toutes les GTPases par ce nucléotide non hydrolysable induit une dépolarisation globale de la membrane augmentant énormément la valeur de  $C_f$ .

### 2.2.3. Le second poste d'imagerie

La technique du protocole ppH a également été réalisée sur un autre microscope Olympus IX71. La procédure d'imagerie et du protocole de ppH sont les mêmes que celle décrite ci-dessus avec des différences mineures. Premièrement, un système d'autofocus externe a été rajouté (FocusTrack, Motion X Corporation). Deuxièmement, une carte électronique Velleman permet le contrôle de l'échange rapide de solutions extracellulaires (Figure 48, Figure 49). Les images ont été obtenues avec un objectif à huile UApo N TIRF 150x (ouverture numérique : 1,45). Enfin une deuxième caméra EMCCD (QuantEM:512SC, Roper Scientific) a été installée grâce à un système double-caméras (TwinCam, Cairn Research) permettant l'imagerie en simultanée de deux longueurs d'onde émises dans le vert (TfR-SEP) et le rouge (dyn1-mEos3.2), ce qui permettra de coupler la technique du ppH au sptPALM (« Description du poste et de l'acquisition » p 127).

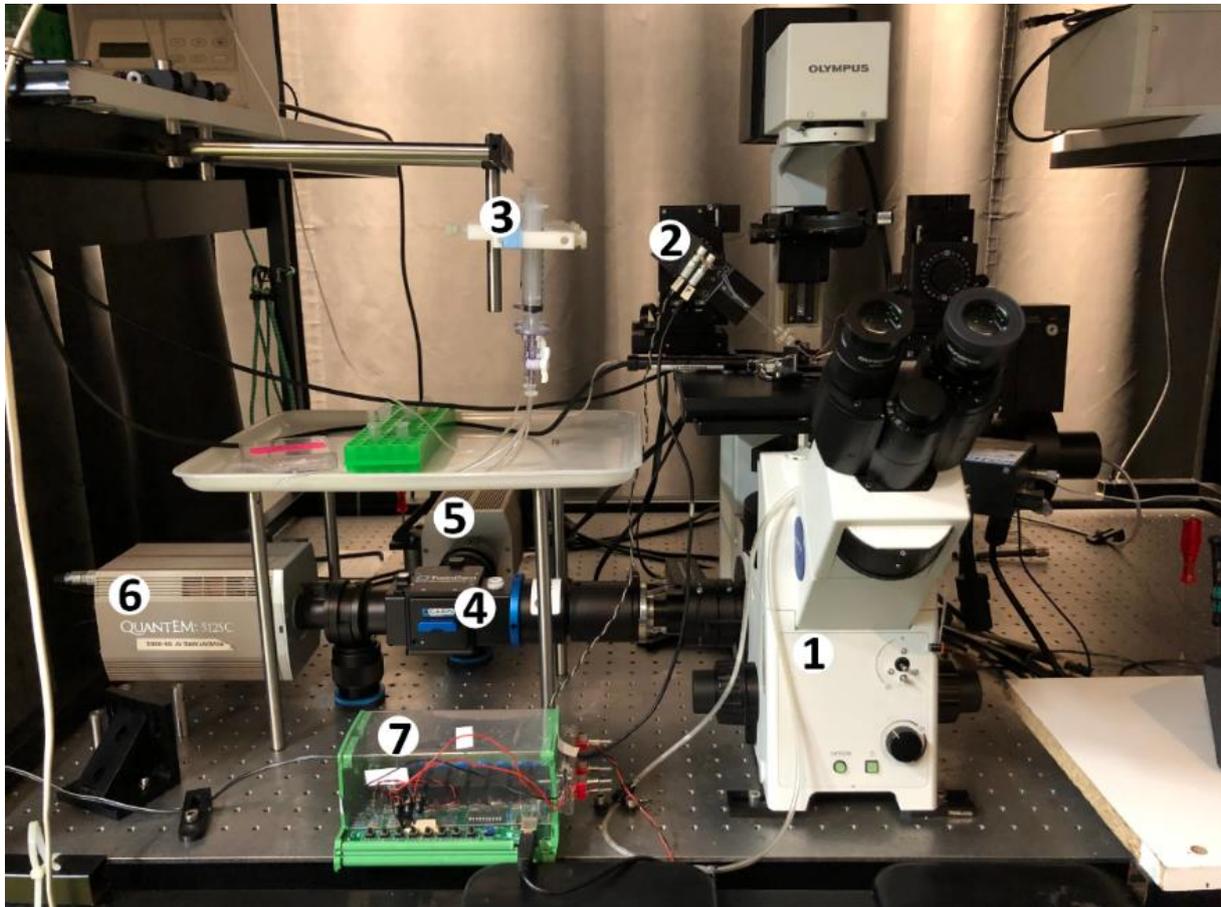


Figure 48 | Poste d'imagerie utilisé pour le couplage du sptPALM et du protocole ppH.

1 : Microscope Olympus IX71 ; 2 : Valves électriques ; 3 : Seringues contenant les solutions à pH 7,4 et 5,5 ; 4 : système double-caméras ; 5 : Caméra pour l'acquisition ET 525/50m ; 6 : Caméra pour l'acquisition ET 595/50m ; 7 : Contrôleur de l'échange rapide des solutions extracellulaires.

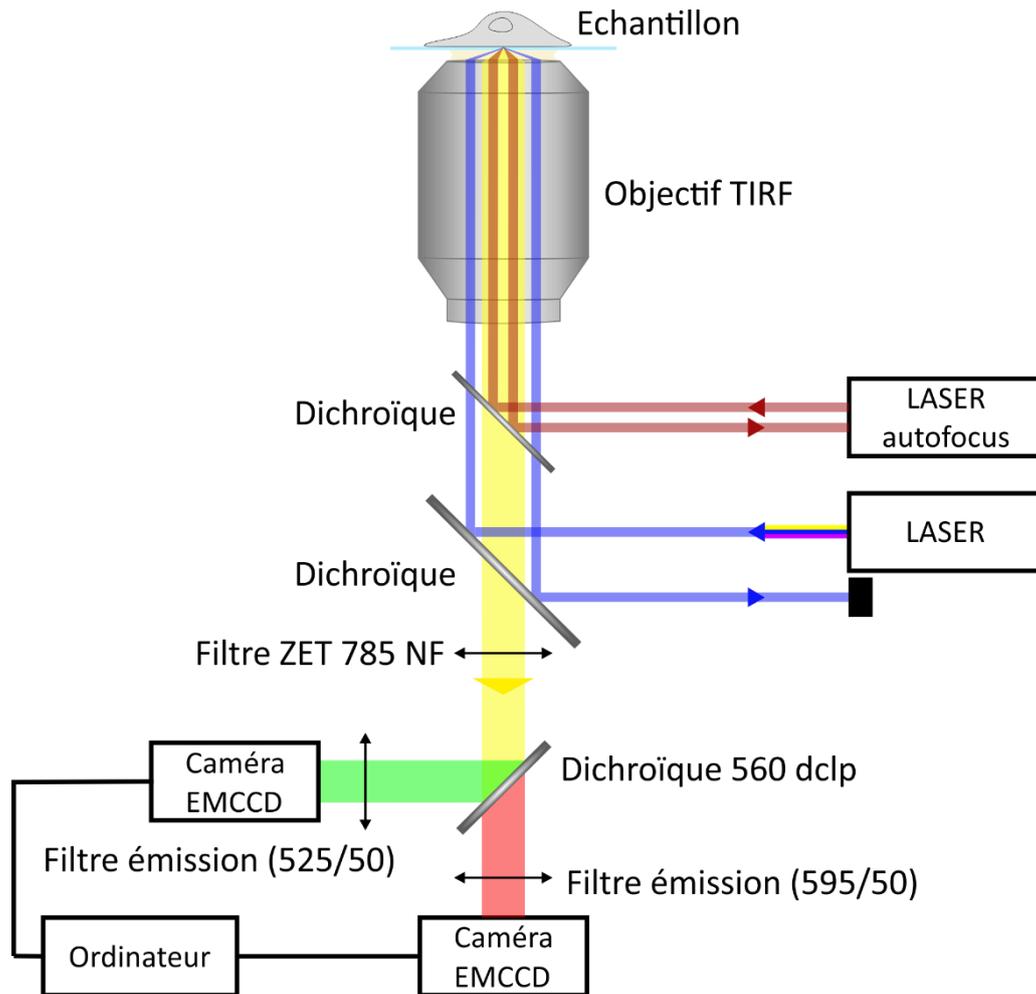


Figure 49 | Schéma du trajet optique du microscope TIRF à deux caméras.

#### 2.2.4. Analyses post-acquisitions

##### 2.2.4.1. Analyse d'image pour la détection de l'endocytose

Les données brutes acquises avec le protocole ppH sont une série d'images prises toutes les 2 secondes, une fois à pH 7,4 et une fois à pH 5,5. Sur les images à pH 7,4, les accumulations (*clusters*) de TfR à la surface membranaire sont visibles tandis que les images prises à pH 5,5 permettent d'observer uniquement les vésicules intracellulaires nouvellement formées.

##### 2.2.4.2. Analyse d'image multidimensionnelle : MIA

Cette analyse permet de détecter et de localiser les PRC tout au long de l'enregistrement. Pour les cellules co-transfectées avec le TfR-SEP et la Dyn1-mCh, soumis au protocole ppH : l'enregistrement d'une cellule est divisé en quatre films, le TfR-SEP à pH 5,5 (TfR5) et à pH 7,4 (TfR7), et la protéine d'intérêt, dynamine-1, fusionnée au mCh, aux deux valeurs de pH (Dyn5 et Dyn7). L'accumulation de

protéines dans chacun des films a été détectée par l'utilisation d'une routine Metamorph appelée MIA (Multidimensional Image Analysis) développée par V. Racine et J-B. Sibarita (Institut Curie, Paris) utilisant la segmentation d'images par ondelettes, pour détecter automatiquement ces accumulations de protéines à la membrane et dans les vésicules, appelées « objets ». Ces objets détectés ont ensuite été suivis à l'aide d'un algorithme de reconstitution simulé afin de suivre les objets sur des images successives (Racine et al., 2006). Le résultat de ce suivi est une série de coordonnées correspondant au centre de masse des objets, avec des identifications uniques (numéros d'évènement). Pour déterminer la durée de vie des PRC à l'aide du Tfr, un autre algorithme de suivi prend en compte les ruptures transitoires dans l'historique des PRC de 1 à 2 images (c'est-à-dire que l'espace vide a été comblé). La liste des coordonnées générées par MIA a été réaffectée dans Matlab à l'aide d'un algorithme utilisant « le plus proche voisin » ("track.pro", John C. Crocker et Eric R. Weeks, <http://www.physics.emory.edu/~weeks/idl/index.html>) (Taylor et al., 2011). Pour les données de la Dyn1-mCh, l'historique de suivi généré par MIA à partir des films Dyn5 et Dyn7 a été combiné et réassigné, tandis que seules les données Tfr7 ont été utilisées. Pour vérifier la fidélité du suivi, les objets ont été superposés à la série d'images originales et inspectés visuellement.

#### 2.2.4.3. Détection des évènements d'endocytose

Tous les objets suivis dans les films Tfr5 ont été examinés pour identifier les véritables évènements d'endocytose à l'aide de routines programmées dans Matlab R2018a (Mathworks). Pour être considéré comme un authentique évènement d'endocytose, chaque évènement candidat devait posséder une vésicule sur l'image Tfr5 :

- **(1)** persistant au moins pour 3 images (c'est-à-dire pendant 8 secondes) suivant son apparition,
- **(2)** qui est apparu au moins 20 images après le début du film, ou 20 images avant sa fin, pour assurer la quantification des signaux pendant 80 secondes avant et après la présence de la vésicule,
- **(3)** qui est apparu et resté à plus de 7 pixels (750 nm) du bord de l'image, pour assurer une quantification correcte,
- **(4)** qui est apparu *de novo* et qui n'a pas été produit par la fusion de deux objets ou la dissociation d'un objet en deux,
- **(5)** qui correspondait à un *cluster* pré-existant dans le film Tfr7 segmenté,
- **(6)** dont la fluorescence était supérieure à un paramètre SNR (pour *signal to noise ratio*) de 5, selon la formule  $SNR = (FO - av) / std$ , où  $FO$  est la fluorescence au temps 0, et  $av$  et  $std$  sont respectivement la fluorescence moyenne et l'écart-type, dans les cinq images avant l'apparition de la vésicule et

- **(7)** qui était proche de la fluorescence maximale au moment de l'apparition.

La pente de la variation de fluorescence dans les trois premières images suivant l'apparition d'une vésicule a été calculée et seulement les vésicules ayant une pente supérieure à 1, correspondant à une augmentation de 100% de la fluorescence ont été gardées (Taylor et al., 2011). Pour vérifier qu'il n'y avait pas de biais dans la procédure de détection et de sélection des événements d'endocytose, un examen visuel a été effectué pour tous les objets suivis pour plusieurs cellules. C'est-à-dire que tous les événements furent vérifiés un à un par nos soins, pour chaque cellule, et ensuite accepté ou rejeté selon d'autres critères (faux positifs, erreur de suivi). Après avoir obtenu un nombre suffisant de cellules analysées et vérifiées, l'ensemble de ces données furent utilisées pour entraîner un programme d'apprentissage supervisé (SVM pour *support vector machine*) destiné à nous remplacer dans l'affinage de vérification des événements d'endocytose détectés.

#### 2.2.4.4. Quantification des événements d'endocytose et co-localisation

Les images en vert (TfR-SEP) et en rouge (Dyn1-mCh) ont été acquises simultanément avec un système de double-vue (Dual View, Roper Scientific) qui a été aligné à l'aide d'une image de billes fluorescentes dans les deux longueurs d'onde (Tetraspeck, 0.2  $\mu\text{m}$  de diamètre, Invitrogen). Des distorsions en x et y entre les deux canaux ont dû être corrigés numériquement afin d'obtenir une co-localisation optimale des billes. La correction est effectuée par une transformation spatiale polynomiale du troisième ordre qui utilise dix billes. La fluorescence a ensuite été quantifiée 20 images avant et 20 images après l'apparition d'une vésicule pour les 4 films (TfR7, TfR5, Dyn7, Dyn5) dans un cercle de 3 pixels de rayon centré 1) sur les coordonnées de l'objet au moment de l'apparition pour l'image 0 et les 20 images précédentes, 2) sur les coordonnées de la vésicule pendant son suivi, puis 3) sur les dernières coordonnées connues après perte du suivi. Le bruit de fond local a été estimé dans un anneau (rayon intérieur de 3 pixels et rayon extérieur de 6 pixels) centré sur le signal en prenant une moyenne de valeurs de pixels entre le 20<sup>ième</sup> et le 80<sup>ième</sup> percentiles pour éviter les contributions des tâches fluorescentes voisines. Pour la correction du passage de la fluorescence verte dans le canal rouge, un coefficient de correction (BT pour bleed-through) a été utilisé pour chaque cellule afin de corriger les valeurs de fluorescence avec la formule  $F_{RFPx,corr} = F_{RFPx} - BT \cdot F_{TfRx}$ , où x est 5 ou 7. De telles corrections sont acceptables car elles n'impliquent que des combinaisons de valeurs linéaires de fluorescence. Avec cette correction, les valeurs de fluorescence des films Dyn5 et Dyn7 peuvent être combinées pour obtenir une résolution temporelle de 2 secondes.

Pour déterminer à quel moment le recrutement d'une protéine fluorescente est devenu significatif, un ensemble de données a été généré en déplaçant aléatoirement les coordonnées des événements dans le masque de la cellule, et a permis de calculer la fluorescence pour les 4 films (TfR5, TfR7, Dyn5 et

Dyn7) comme décrit ci-dessus. 200 ensembles de données aléatoires ont été générés pour chaque cellule, puis la moyenne des mesures de fluorescence a été combinée pour déterminer, pour chaque point de donnée, des intervalles supérieurs et inférieurs de 95%. Les événements de scission se divisent en deux catégories : les événements terminaux, où le cluster visible à pH 7,4 disparaît <40 s après la scission, et les événements non terminaux, où il reste visible (Merrifield et al., 2005; Taylor et al., 2011). Pour trier les événements en événements terminaux et non-terminaux, les fluorescences moyennes de 4 images avant la scission et de 9 images après la scission du film TfR7 ont été mesurées. Le rapport entre ces deux valeurs de fluorescence a été ensuite utilisée pour déterminer si l'évènement était terminal (rapport de 0.4) ou non terminal (rapport de 0.6). Les événements avec des ratios proches de 0.5 n'ont pas été triés. Pour déterminer le moment du pic maximal de recrutement de la fluorescence dans le rouge (dyn1-mCh), un niveau de bruit a été estimé avec l'écart-type des six dernières valeurs de fluorescence dans le rouge (12 secondes) de l'enregistrement. Si le maximum est supérieur au seuil (de 6 fois le bruit au-dessus de la moyenne), le temps de la valeur maximale de fluorescence dans le rouge est pris comme le temps de recrutement maximal de la protéine rouge.

#### 2.2.4.5. Quantification de la fréquence des événements d'endocytose

Afin de comparer l'efficacité de différents inhibiteurs de l'endocytose, une routine Matlab a été utilisée pour quantifier et normaliser la diminution de l'activité endocyttaire d'une cellule dialysée avec ces inhibiteurs. Pour chaque cellule, la fréquence des événements détectés dans les enregistrements en configuration « cellule attachée » et « cellule entière » ont été représentés sous forme de courbes cumulées. Ces tracés ont ensuite été normalisés en fonction du nombre d'événements détectés lors de l'enregistrement d'une cellule en configuration « cellule attachée » (également appelé activité endocyttaire basale). Dans ces tracés normalisés, chaque cellule affichait ainsi 100 événements sur la 70<sup>ème</sup> image de l'enregistrement en configuration « cellule attachée ». Les cellules soumises au même traitement ont donc pu être regroupées en dépit de la grande variabilité de leur activité endocyttaire basale absolue. L'efficacité des inhibiteurs de l'endocytose a été déduite pour chaque cellule comme étant le rapport de la fréquence des événements survenant dans les deux dernières minutes de l'enregistrement en « cellule entière » (configuration dans laquelle l'inhibiteur est dialysé dans la cellule) sur la fréquence des événements dans les deux premières minutes de l'enregistrement en « cellule attachée ». Ce rapport a ensuite été moyenné sur l'ensemble des cellules dialysées avec le même bloqueur pour fournir une mesure quantitative de son efficacité de blocage (Figure 50).

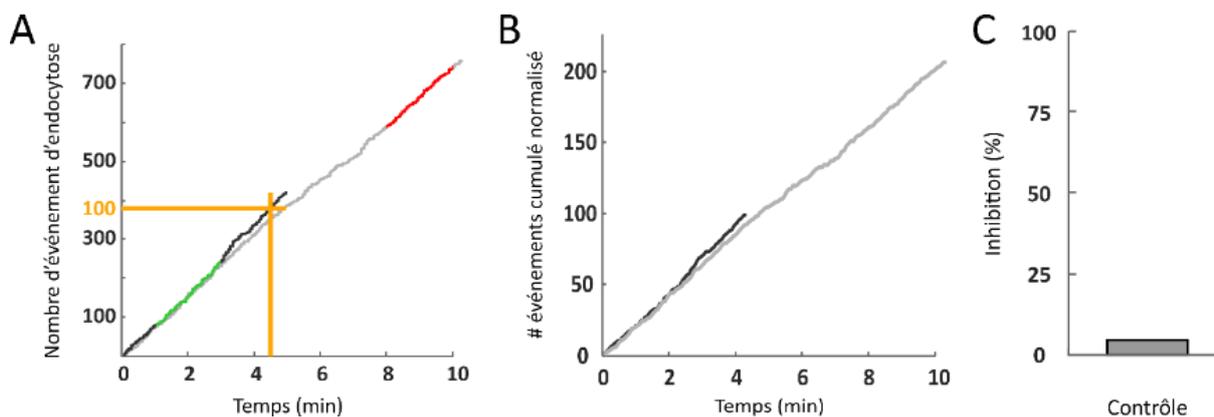


Figure 50 | Normalisation et quantification de l'efficacité d'inhibition des différents bloqueurs de l'endocytose.

**(A)** Pour chaque cellule visualisées pendant le protocole ppH, le nombre d'événements d'endocytose détectés pendant les enregistrements en configuration « cellule attachée » (courbe noire) et en « cellule entière » (courbe gris) a été représenté en fonction du temps et normalisé à 100, cinq images avant la fin de l'enregistrement attaché à la cellule (270 s, lignes oranges). Nous avons ensuite déterminé l'activité d'endocytose restante en calculant le rapport du nombre d'événements survenant dans les deux dernières minutes de l'enregistrement en « cellule entière » (surlignage rouge) sur le nombre des événements dans les deux premières minutes de l'enregistrement en « cellule attachée » (surlignage vert). **(B)** Normalisation du nombre d'événements de la cellule en (A). **(C)** L'efficacité inhibitrice d'un traitement est quantifiée à  $100 - (\text{nombre normalisé en cellule entière})$ . Dans ce cas, la cellule n'a pas été traitée avec un inhibiteur.

## 2.3. Le FRAP (Retour de Fluorescence Après Photoblanchiment)

### 2.3.1. Description du FRAP

La technique de Retour de Fluorescence après Photoblanchiment (FRAP) a été développée dans les années 1970 par Axelrod et collègues avec le but d'étudier la mobilité de protéines dans des cellules vivantes, en mesurant le taux de retour de fluorescence après le photoblanchiment d'une région donnée dans ces cellules (Axelrod et al., 1976; Of et al., 1976). Cette technique était utilisée à l'origine pour mesurer la diffusion au niveau des membranes plasmiques (Liebman P A and Entine G, 1974; Liss and Slater, 1974) mais grâce au développement de nouvelles sondes fluorescentes et de la microscopie confocale cette technique a pu évoluer et devenir populaire pour l'étude de la mobilité de protéines à l'intérieur des cellules. Ainsi, le FRAP est maintenant reconnu comme étant une bonne technique pour l'étude de la dynamique de protéines dans les cellules vivantes. En effet, cette technique est fréquemment utilisée de nos jours pour l'étude de dynamiques de protéiques dans différents modèles d'étude cellulaires tels que la dynamique du cytosquelette, du transport vésiculaire, des adhésions cellulaires, de la mitose, de la structure de la chromatine, de la transcription, de la mobilité de l'ARNm et des molécules qui interagissent avec l'ADN, du recyclage de protéines et la transduction de voies de signalisations, entre autres (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012). Les molécules fluorescentes sont de

façon générale susceptibles au photoblanchiment, comme le démontre la lente perte de signal au long du temps lorsqu'une source de lumière de faible intensité est appliquée sur un échantillon. Ce phénomène de photoblanchiment augmente considérablement avec l'intensité de la lumière d'excitation jusqu'à un tel point où l'application d'une intense source laser peut photoblanchir une cellule/région cellulaire en quelques millisecondes (De Los Santos et al., 2015). Le FRAP prend parti de cette capacité de photoblanchiment des molécules fluorescentes pour l'appliquer dans des régions cellulaires d'intérêt en utilisant un laser correspondant à la longueur d'onde de fluorescence de la molécule utilisée et ce pendant une courte durée de temps (en règle générale 20 millisecondes). Après ce photoblanchiment d'une région cellulaire d'intérêt, le retour du signal de fluorescence créé par l'entrée des fluorophores adjacents est enregistré (Figure 51). Les signaux obtenus, appelés **courbes de retour de fluorescence**, peuvent être utilisées pour déduire les paramètres caractéristiques de la dynamique (coefficient de diffusion, constante d'association-dissociation, ...). Les courbes de retour de fluorescence comprennent trois phases : un plateau initial qui mesure l'intensité dans la région photoblanchie, une phase transitoire durant laquelle la fluorescence augmente à cause de la diffusion des molécules fluorescentes et un plateau final dont l'intensité de fluorescence peut être inférieure à l'intensité initiale mesurée dans la région d'intérêt (Figure 52). Cette technique permet ainsi de mesurer trois paramètres : 1) la **fraction de molécules immobiles** présente dans la région et qui représente l'écart d'intensité entre le plateau initial et le plateau final (molécules très stables qui n'ont pas été échangées pendant le temps d'enregistrement), 2) la fraction de molécules fluorescentes qui peuvent participer dans des échanges et qui représente la **fraction de molécules mobiles** dans la région photoblanchie, 3) ainsi comme la **constante de taux de récupération** du signal qui est une mesure de la vitesse à laquelle les molécules se déplacent vers et en dehors de la région photoblanchie (cette constante est en rapport avec le coefficient de diffusion). Ainsi, cette technique nous permet d'étudier les propriétés et caractéristiques de certaines molécules dans leur environnement mais aussi de déterminer l'éventuel effet d'un inhibiteur ou d'une mutation sur la dynamique de protéines dans des cellules vivantes. Cependant, cette technique ne permet l'étude de la dynamique de protéines qu'à l'échelle d'une population de protéines et doit être étudiée comme telle. Pour une étude plus précise de protéines au niveau de la molécule unique, l'utilisation de techniques de super-résolution comme le PALM (pour PhotoActivated Laser Microscopy) ou le STORM (pour Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) est indispensable (« Description du PALM et du sptPALM » p123).

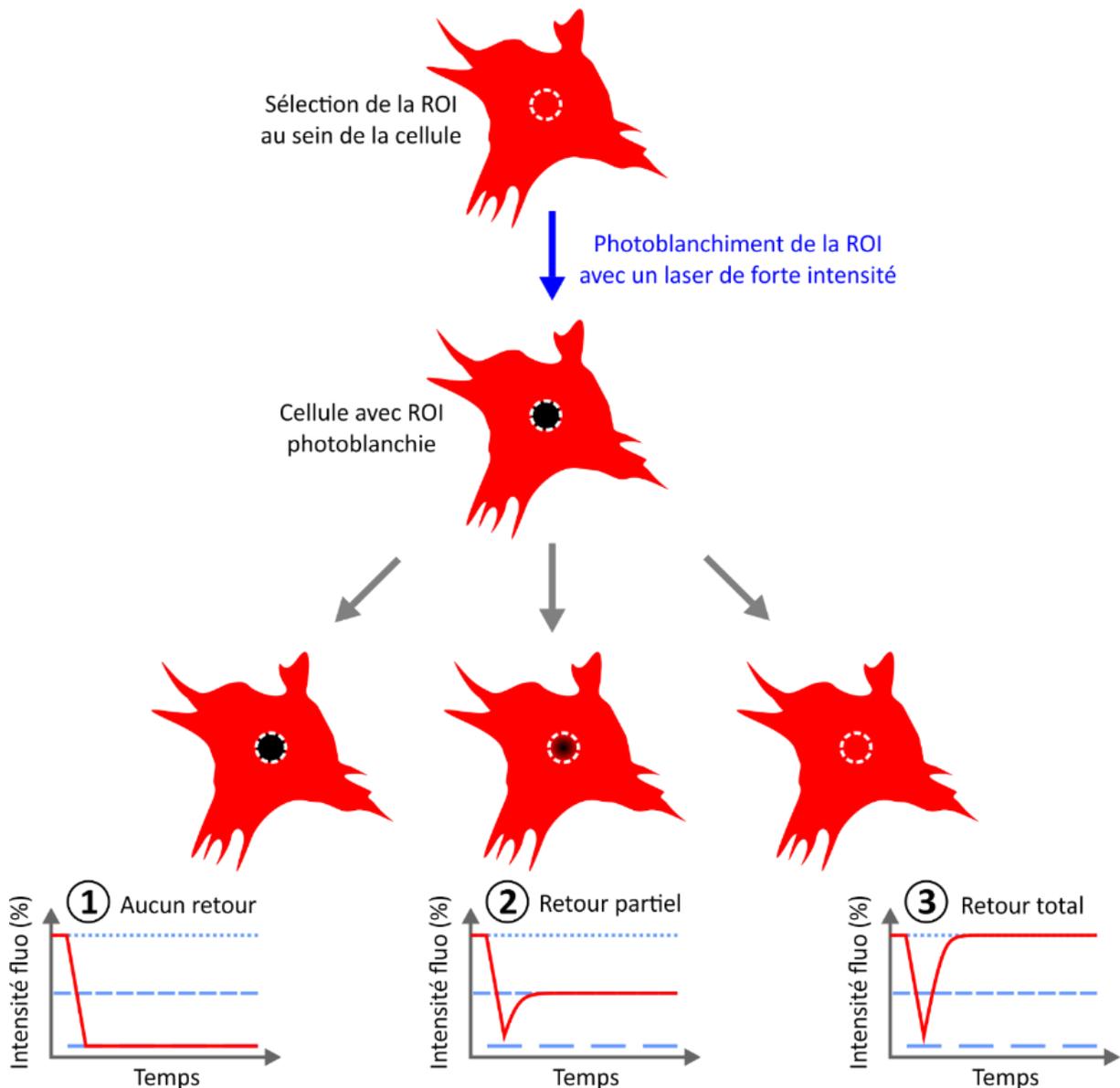
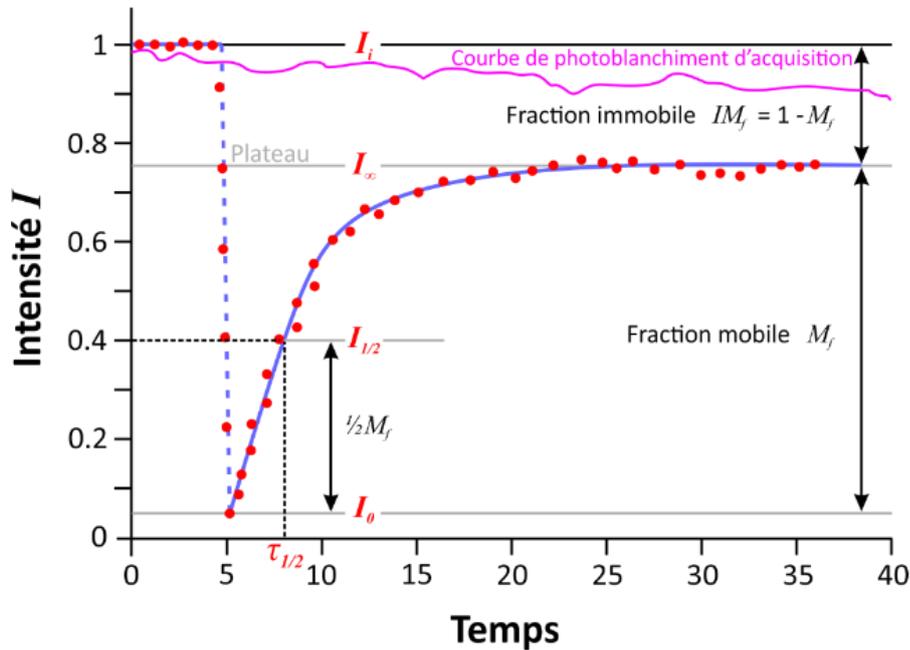


Figure 51 | Principe du FRAP.

Le FRAP peut être décomposé en trois étapes : Pré-photoblanchiment, photoblanchiment et post-photoblanchiment. Dans l'étape de pré-photoblanchiment, l'ensemble de l'échantillon est éclairé à l'aide d'une source lumineuse de faible intensité pour obtenir un signal de référence. Dans l'étape de photoblanchiment, les molécules à l'intérieur de la région d'intérêt (ROI) sont photoblanchies à l'aide d'un laser de forte intensité pendant une brève période de temps (100 millisecondes). Pendant l'étape de post-photoblanchiment, l'échantillon est éclairé par une source lumineuse de faible intensité, et le mouvement des molécules photoblanchies, hors de la région de photoblanchiment original est enregistré. L'étape de post-photoblanchiment fournit des informations sur la récupération fractionnée (trois possibilités représentées en 1, 2 et 3), et le coefficient de diffusion de la fraction mobile (souvent déduit du  $\frac{1}{2}$  temps de la récupération de fluorescence).

Source : Adaptée de De Los Santos et al., 2015



$$(1) \quad M_f = \frac{I_\infty - I_0}{I_i - I_0}$$

$$(2) \quad I_{1/2} = \frac{I_\infty + I_0}{2}$$

Figure 52 | Anatomie d'une courbe FRAP typique.

A partir de l'intensité de fluorescence initiale (avant photoblanchiment) ( $I_i$ ), le signal chute à une valeur particulièrement faible ( $I_0$ ) lorsque le faisceau laser de forte intensité photoblanchit les fluorophores dans la région d'intérêt (ROI). Au cours du temps, le signal passe de l'intensité post-photoblanchiment ( $I_0$ ) à une valeur maximale de plateau ( $I_\infty$ ). A partir de ce graphique et des équations (1) et (2), la fraction mobile ( $M_f$ ), la fraction immobile ( $IM_f$ ),  $I_{1/2}$  et le temps correspondant ( $\tau_{1/2}$  qui représente le temps d'échange de la moitié de la fraction mobile entre les zones photoblanchies et non photoblanchies) peuvent être calculés. La courbe de photoblanchiment est utilisée pour corriger la perte en fluorescence pendant l'acquisition est représentée en magenta sur le graphique. Les informations de la courbe de récupération (de  $I_0$  à  $I_\infty$ ) peuvent être utilisées pour déterminer la constante de diffusion et la dynamique de liaison des protéines marquées par fluorescence. Sur la base de différents profils de récupération, la mobilité des protéines peut être classée comme suit (Figure 51) : **(1)** Immobile, **(2)** mobile intermédiaire avec une fraction immobile ou **(3)** mobile avec pratiquement aucune fraction immobile.

Source : Adaptée de Ishikawa-Ankerhold et al., 2012

### 2.3.2. Description du poste et de l'acquisition

Les acquisitions sont réalisées avec le logiciel Metamorph (Molecular Device) avec un microscope inversé (Nikon Ti-Eclipse) placé dans un caisson thermostaté à 37°C muni d'un système d'auto-focalisation (Perfect Focus System, Nikon). Les images ont été obtenues avec un objectif à huile Apo TIRF 100x (ouverture numérique : 1,49). Les images ont été acquises à l'aide d'une caméra Evolve EMCCD camera (Photometrics, Tucson, USA). Les lamelles de verre avec les échantillons cellulaires sont montées dans une chambre Ludin (Life Imaging Services) avant acquisition.

### 2.3.2.1. FRAP

Les cellules NIH-3T3 co-exprimant les constructions dyn1-mCh et dyn1-GFP ont été montées en chambre Ludin (Life Imaging Services) dans une solution d'HBS. Le banc laser dispose d'une deuxième sortie de fibre optique reliée à un dispositif d'éclairage contenant deux miroirs de balayage galvanométriques en x/y (ILAS, Roper Instrument) pilotés par Metamorph. Il permet un contrôle spatial et temporel précis du faisceau laser focalisé sur n'importe quelle zone d'intérêt sélectionnée dans l'échantillon pour un photoblanchiment ciblé. La communication entre les deux fibres pour alterner entre l'imagerie et le blanchiment s'effectue dans une plage de temps de l'ordre de la milliseconde en utilisant un AOTF (pour *acousto-optical tunable filter*). L'acquisition de l'imagerie en TIRF a été réalisée en utilisant un laser de longueur d'onde 488 nm pour la dyn1-GFP et 561 nm pour la dyn1-mCh. Dans ce protocole expérimental, le laser 561 est utilisé pour photoblanchir la dyn1-mCh alors que le laser 488 est utilisé pour visualiser la dyn1-GFP tout le long du protocole de FRAP et nous permet ainsi de vérifier si le PRC photoblanchi (avec le laser 561nm) est présent tout le long du protocole d'imagerie. L'acquisition a été effectuée avec une pré-acquisition de 10 secondes à 2Hz afin de mesurer la fluorescence de base dans le vert et le rouge, puis le photoblanchiment sélectif et rapide de plusieurs zones circulaires de diamètre de 8 pixels (1.28  $\mu\text{m}$ ), au niveau des PRC identifiés par la dyn1-mCh, a été obtenu avec une puissance laser élevée à 561 nm pendant 400 ms. L'intensité de fluorescence a été réduite entre 60% et 70% après le photoblanchiment. La récupération de la fluorescence a été enregistrée immédiatement après cette séquence de blanchiment pendant 90 secondes avec une fréquence d'acquisition de 2Hz pendant 10 secondes, puis 0,5 Hz pendant 20 secondes et 1Hz pour les 60 dernières secondes. Le photoblanchiment d'observation a été maintenu à un niveau très bas, en évaluant les zones non photoblanchies témoins à proximité.

### 2.3.2.2. Analyse d'images

Les signaux de fluorescence associés à la dyn1-GFP et à la dyn1-mCh sont mesurés dans les régions photoblanchies à 561 nm et sont notés respectivement  $f^{GFP}(t)$  et  $f^{mCh}(t)$ . Le signal  $f^{GFP}(t)$ , non photoblanchi, permet de s'assurer que le PRC reste présent tout au long de l'observation et de normaliser le signal  $f^{mCh}(t)$  à la quantité de dyn1-GFP présent au PRC. Le bruit de fond moyen mesuré en dehors des cellules ( $f_{fond}^{GFP}(t)$ ,  $f_{fond}^{mCh}(t)$ ) et le photoblanchiment lié à l'observation mesuré sur l'ensemble des cellules ( $f_{totale}^{GFP}(t)$ ,  $f_{totale}^{mCh}(t)$ ) sont utilisés pour corriger les signaux. Les signaux corrigés notés respectivement  $F^{GFP}(t)$  et  $F^{mCh}(t)$  sont obtenus en utilisant les relations :

$$F^{mCh}(t) = (f^{mCh}(t) - f_{fond}^{mCh}(t)) / \frac{f_{totale}^{mCh}(t) - f_{fond}^{mCh}(t)}{f_{totale}^{mCh}(0) - f_{fond}^{mCh}(0)}$$

$$F^{GFP}(t) = (f^{GFP}(t) - f_{fond}^{GFP}(t)) / \frac{f_{totale}^{GFP}(t) - f_{fond}^{GFP}(t)}{f_{totale}^{GFP}(0) - f_{fond}^{GFP}(0)}$$

Ensuite, la fluorescence corrigée associée à la dyn1-mCh est normalisée entre 0 (fluorescence après photoblanchiment :  $F_{GFP}^+$ ) et 1 (fluorescence moyenne avant photoblanchiment :  $F_{mCh}^-$ ), selon les relations :

$$\tilde{F}^{mCh}(t) = \frac{F^{mCh}(t) - F_{mCh}^+}{F_{mCh}^- - F_{mCh}^+}$$

Tandis que la fluorescence associée à la dyn1-GFP est normalisée par rapport à 1 (fluorescence moyenne initiale (avant photoblanchiment de la dyn1-mCh)) :

$$\tilde{F}^{GFP}(t) = \frac{F^{GFP}(t)}{F_{GFP}^-}$$

Enfin, pour tenir compte de la nature labile des PRC, la fluorescence de la dyn-1-mCh ( $\tilde{F}^{mCh}(t)$ ) a été normalisée avec le signal de fluorescence de la dyn-1-GFP ( $\tilde{F}^{GFP}(t)$ ) en utilisant la formule :

$$\tilde{F}^{mCh/GFP} = \frac{\tilde{F}^{mCh}(t)}{\tilde{F}^{GFP}(t)}$$

La moyenne des données peut être calculée pour obtenir la récupération du photoblanchiment par acquisition, par cellule ou par condition. Les données ont été représentées avec l'intensité de fluorescence normalisée en fonction du temps.

## 2.4. Le sptPALM

### 2.4.1. Description du PALM et du sptPALM

La biologie cellulaire moderne dépend largement des techniques de microscopie à fluorescence pour étudier les phénomènes clés dans des structures cellulaires ou dans le comportement de molécules. Dû à sa nature non-invasive et au développement constant de nouveaux outils/technologies, la microscopie à fluorescence est de nos jours la stratégie préférée pour l'étude de cellules fixées ou vivantes (Henriques et al., 2011). Cependant les techniques conventionnelles de microscopie (épifluorescence, confocal, etc.) ne fournissent qu'une résolution optique maximale de 200 nm latéralement et 500 nm axialement. Ceci empêche donc l'étude de l'information structurale au niveau de molécules uniques d'ADN, ARN ou encore des protéines, qui peuvent exister comme molécules uniques à des échelles de quelques nanomètres. Il est pourtant important de comprendre

l'organisation et la mobilité des protéines pour pouvoir comprendre comment les cellules fonctionnent et communiquent entre elles. Ces informations sont cruciales pour comprendre comment les cellules se comportent dans leur « milieu naturel », mais également pour déterminer leurs éventuelles interactions avec des complexes macromoléculaires que l'on peut retrouver dans les cellules, qui peuvent être affectées/modifiées dans des conditions pathologiques (Sibarita, 2014).

Parmi les techniques permettant d'étudier la mobilité des protéines on peut retrouver le très populaire FRAP (ci-dessus « Description du FRAP » p118) et le FCS (pour Fluorescence Correlation Spectroscopy). Cependant, ces techniques sont des méthodes d'imagerie « d'ensemble » (de masse) développées dans les années 1970 qui ne nous donnent qu'une estimation de la moyenne de la dynamique d'une population de molécules et non pas d'une molécule unique. Un autre désavantage de l'utilisation de ces techniques est le fait qu'elles utilisent un principe d'imagerie sur un seul point/région d'une cellule et ainsi ne prennent pas en compte l'hétérogénéité intracellulaire. De plus, la diffraction de la lumière représente une limitation pour ces techniques et empêche ainsi l'étude de l'organisation moléculaire des protéines à des échelles inférieures à 200 nm.

Grâce au développement de nouvelles techniques depuis les dernières décennies, nous avons pu passer cette barrière de diffraction et augmenter la résolution des microscopes à fluorescence. Ces techniques peuvent être divisées en trois classes principales : le STED (pour STimulated Emission Depletion), le SIM (pour Structured Illumination Microscopy), et finalement les techniques de microscopie de localisation de fluorophores individuels telles que le PALM (pour PhotoActivated Localization Microscopy) et le STORM (pour Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) (Owen et al., 2012). Les techniques de microscopie de localisation sont souvent conduites en utilisant de façon simultanée le TIRF (« Microscopie de fluorescence par réflexion interne totale (TIRF) » p101) pour limiter le volume d'excitation dans les premiers 100 nm de l'interface lamelle-cellule et représentent ainsi une approche intéressante et efficace pour l'étude de protéines à la membrane plasmique des cellules.

La technique du PALM (pour PhotoActivated Localization Microscopy), comme les autres techniques de localisation de fluorophores individuels (STORM pour Stochastic Optical Reconstruction Microscopy et PAINT pour Point Accumulation in Nanoscale Topography) a pour but de séparer temporellement des molécules très proches de sorte que seule une petite fraction est imagée à chaque instant. Dans le cas du PALM, cela est réalisé en utilisant des protéines fluorescentes photoconvertibles, comme la mEos3.2 (« Protéine fluorescente photoconvertible mEos3.2 » p126). Une illumination à faible intensité de lumière à 405 nm, induit la photoconversion d'une petite partie des molécules qui sont détectées comme des molécules uniques, dynamiques et espacées entre elles. On peut alors localiser

le centre de ces molécules uniques avec une précision de quelques dizaines de nanomètre. Enfin, dû à l'intensité de l'illumination du laser utilisé pour imager ces molécules uniques, celles-ci finissent par photoblanchir, permettant ainsi d'imager un nouvel ensemble de molécules uniques photoconverties préalablement, et ce sur plusieurs cycles (quelques milliers) de photoactivation/détection (Figure 53).

De façon importante, le PALM peut être combiné au SPT (Single Particle Tracking). Le SPT est une technique d'étude de molécule unique développée dans les années 1980 permettant de quantifier les coefficients de diffusion de récepteurs uniques (Barak and Webb, 1982), ou encore de localiser et suivre des molécules membranaires individuellement (Jeff et al., 1988). Le SPT combiné au PALM (sptPALM) permet donc la reconstruction des trajectoires de molécules uniques dans des cellules vivantes (Nair et al., 2013; Opazo et al., 2012). Ces deux techniques combinées peuvent donc nous donner des informations cruciales sur la diffusion des protéines à la membrane plasmique mais aussi sur leur état d'aggrégation et peuvent ainsi nous permettre d'identifier l'effet de certains inhibiteurs/activateurs ou encore de certaines mutations sur le comportement des protéines.

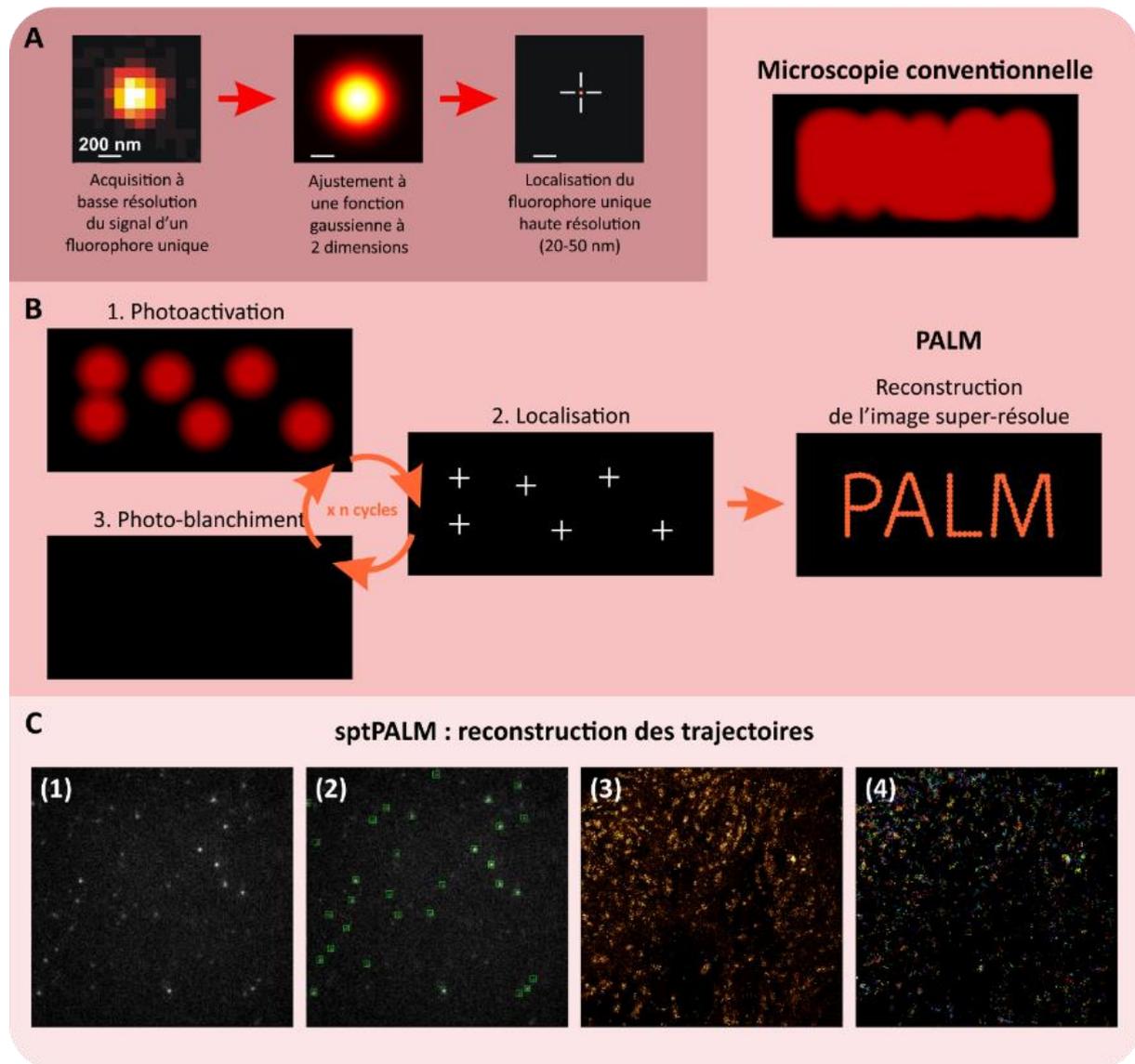


Figure 53 | Principe du PALM et du sptPALM.

(A) Principe de la localisation super-résolutive. (B) Schéma de mise en œuvre du PALM et comparaison des images obtenues en PALM et en microscopie conventionnelle. (C) Principe de détection des molécules uniques, de leur détection et localisation et reconstruction de leurs trajectoires : (1) Acquisition d'une image de molécules uniques, (2) détection et localisation des molécules uniques, (3) ensemble des détections de molécules uniques obtenues sur la totalité d'un film d'acquisitions et (4) reconstruction des trajectoires des molécules uniques.

#### 2.4.2. Protéine fluorescente photoconvertible mEos3.2

La technique de PALM repose sur l'utilisation de fluorophores photoactivables ou photoconvertibles. Nous avons utilisé dans notre étude la protéine fluorescente photoconvertible monomérique mEos3.2 (nommée d'après la déesse grecque de l'aube, Éos) couplée à notre protéine d'intérêt. La mEos3.2 possède une fluorescence dans le vert (488 nm) pouvant passer à une fluorescence dans le rouge (561 nm) lors d'une irradiation aux UV (405 nm) (Figure 54A). Il est important de noter que la fluorescence

de mEos3.2 avant photoconversion est faible, ce qui permet de co-transfecter des cellules avec une protéine fusionnée à la GFP ou la SEP sans une trop grande contamination par la mEos3.2 (Rossier et al., 2012). Les UV induisent une rupture du squelette peptidique près du chromophore de cette protéine (Figure 54B). Ainsi en jouant sur l'intensité du laser UV, les protéines d'intérêt couplées à la mEos3.2 peuvent être photoconverties dans le rouge de façon stochastique et permettre la visualisation et le suivi d'un petit nombre de molécules uniques en sptPALM.

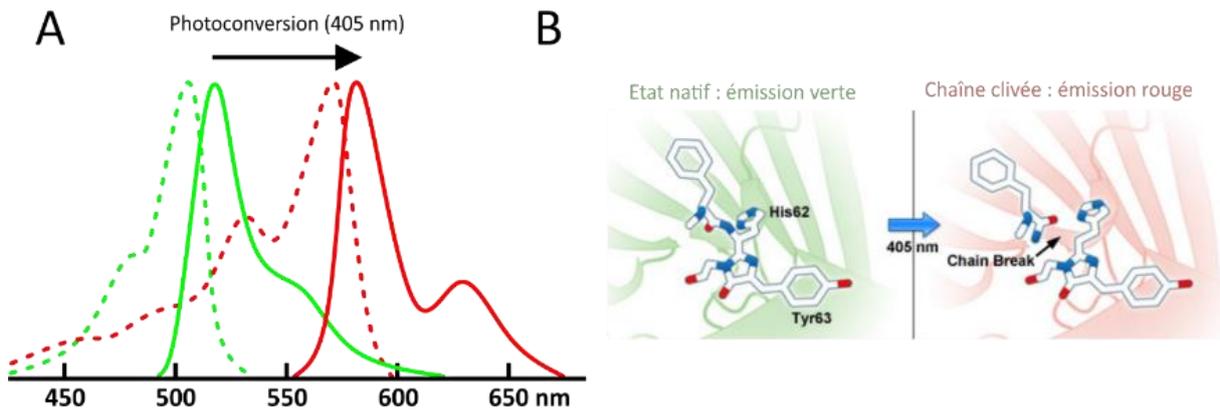


Figure 54 | Spectre d'émission et d'absorption de la mEos3.2.

**(A)** La mEos3.2 émet une fluorescence verte à 516 nm et peut être photoconvertie en fluorescence rouge (581 nm) lorsqu'elle est éclairée avec un laser UV (405 nm). **(B)** Le rayonnement ultraviolet (405 nm) induit le clivage du squelette peptidique entraînant la photoconversion d'une fluorescence verte au rouge.

Source : <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/highlighterfps.html>

#### 2.4.3. Description du poste et de l'acquisition

J'ai utilisé pour l'ensemble des expériences des cellules co-transfectées avec un fluorophore vert (clathrine-GFP ou TfR-SEP) et une protéine fusionnée à mEos3.2. La première étape a été la sélection des cellules transfectées exprimant le TfR-SEP dans le vert. Le sptPALM a été réalisé avec un laser 561 nm de faible puissance et la photoconversion des molécules de mEos3.2 couplées à la dynamine 1 (dyn1-mEos3.2) a été induite par une impulsion rapide (quelques secondes) et faible de laser 405 nm.

**(1)** Une partie des acquisitions du sptPALM réalisées sur les cellules NIH-3T3 a été effectuée avec le microscope Olympus IX71 avant l'ajout de la deuxième caméra (« Le second poste d'imagerie » p113). Les lamelles de verre avec les échantillons cellulaires sont montées dans une chambre Ludin (Life Imaging Services) avant acquisition. Les acquisitions sont ensuite réalisées avec le logiciel Metamorph (Molecular Device). L'acquisition a été pilotée par le logiciel Metamorph (Molecular Devices) en mode streaming à 50 Hz. Le TfR-SEP a été imagée à l'aide d'un cube filtrant GFP classique (ET 525/50, Chroma). La dyn1-mEos3.2 a été imagée à l'aide d'un cube filtrant GFP (Figure 55).

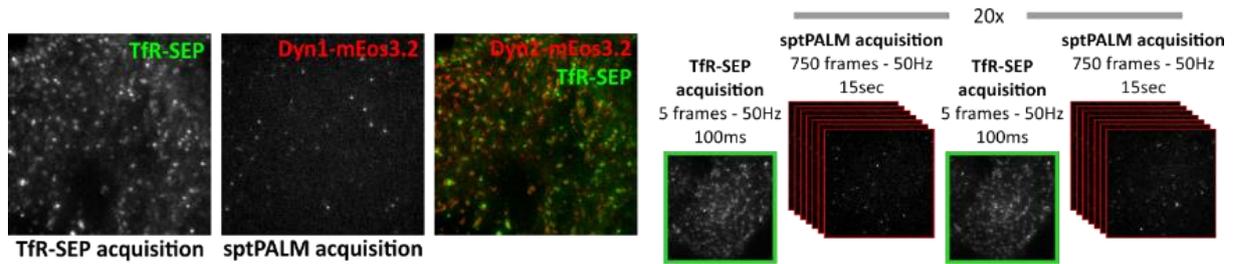


Figure 55 | Description des acquisitions de sptPALM.

Alternance d'acquisitions de sptPALM de dyn1-mEos3.2 à 50 Hz avec le TfR-SEP (durée totale de l'enregistrement = 10 minutes).

Une autre méthode d'acquisition a été mise en place suite à l'ajout d'une seconde caméra sur le microscope TIRF (« Le second poste d'imagerie » p113). L'acquisition du sptPALM a été faite en continue sur une caméra et le protocole de ppH a été appliqué, comme précédemment expliqué, sur les cellules en parallèle et imagé sur la seconde caméra (Figure 49).

**(2)** Afin de pouvoir coupler le protocole de ppH à la technique de sptPALM, la suite des expériences de sptPALM sur les cellules MEF TKO Dynamine, a été réalisé sur le microscope Olympus IX71 (« Le second poste d'imagerie » p113) équipé d'une deuxième caméra Evolve EMCCD camera (QuantEM:512SC, Roper Scientific) grâce à un système double-caméras (TwinCam, Cairn Research) permettant l'imagerie en simultanée de deux longueurs d'onde émises dans le vert (TfR-SEP) et le rouge (dyn1-mEos3.2) (Figure 56). Ceci m'a permis de mesurer l'activité d'endocytose et d'observer simultanément le comportement diffusif de molécules uniques de dynamine. Les résultats obtenus précédemment sur les cellules NIH-3T3 ont été reproduits sur ce poste permettant le regroupement des résultats obtenus quel que soit le poste utilisé.

La fluorescence a été obtenue par la combinaison d'un filtre dichroïque et d'un filtre d'émission (ET 525/50 nm) pour l'acquisition des données de ppH (TfR-SEP) sur la caméra 1 et un filtre d'émission (ET 632/60 nm) pour l'acquisition des données de sptPALM (Dyn1-mEos3.2) sur la caméra 2.

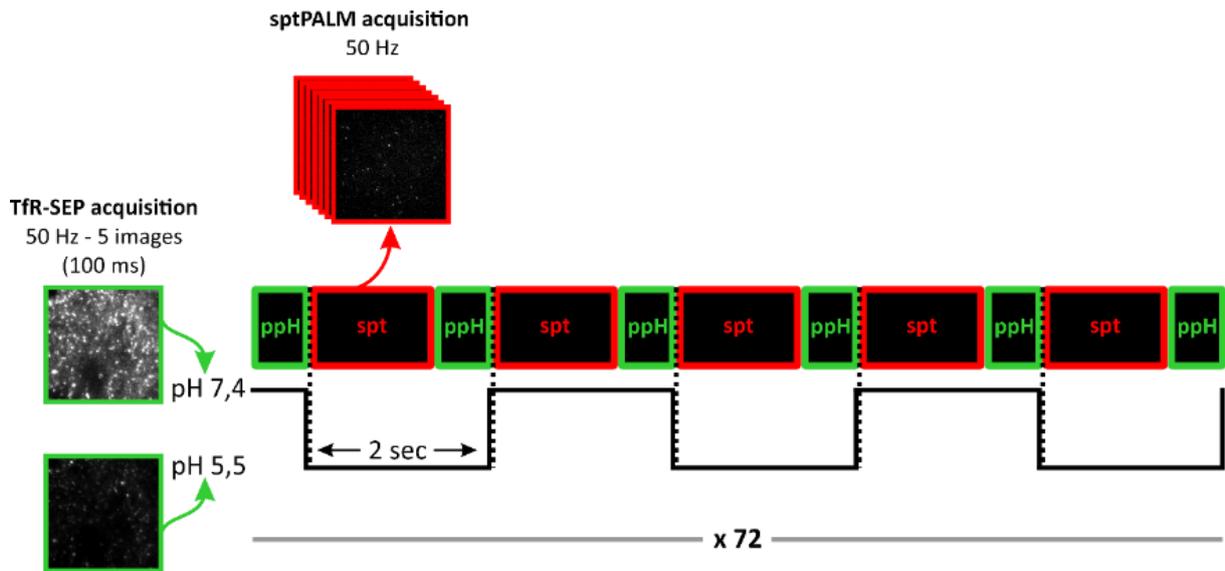


Figure 56 | Description des acquisitions lors du couplage du sptPALM avec le protocole ppH.

Acquisition en simultanée de films de sptPALM à 50 Hz de 600 images dans le rouge et de la formation des vésicules d'endocytose avec le Tfr-SEP soumis au protocole de ppH (durée totale de l'enregistrement = 12 min).

#### 2.4.4. Analyses d'image de sptPALM

Les enregistrements de sptPALM ont été analysés à l'aide d'un module Métamorph appelé PalmTracer développé au sein du laboratoire dans l'équipe de Jean-Baptiste Sibarita en collaboration avec l'équipe de Maxime Dahan (Institut Curie, Paris) (Izeddin et al., 2012).

##### 2.4.4.1. Détection et localisation

###### **Localisation gaussienne**

La première étape consiste à déterminer la position (x, y) de chaque molécule individuelle (protéines marquées par fluorescence) avec une précision sub-pixellaire de l'ordre de la dizaine de nanomètres (~50 nm), bien en dessous de la limite de diffraction de la lumière (généralement de ~250 nm), et ce dans chaque des images de l'acquisition. L'image d'une molécule individuelle à travers le système optique est représentée par la fonction d'étalement du point (PSF, pour *Point Spread Function*) qui reflète la distribution spatiale des photons émis par la molécule et collectés dans le plan du capteur. Il s'agit d'une tâche de diffraction de type tâche d'Airy constituée d'une tâche brillante centrale auréolée de cercles concentriques de plus faibles intensités (Figure 57B). Cette tâche d'Airy peut être approximée par une gaussienne bidimensionnelle. Ainsi, la position de chaque molécule individuelle peut être déterminée en ajustant sa PSF par une gaussienne bidimensionnelle dont le maximum correspond au centre de la molécule (Figure 57C). La position des molécules individuelles est résolue

avec une précision de pointée de l'ordre de la dizaine de nanomètres (20-40 nm) en fonction du rapport signal sur bruit de l'image. La précision de pointée correspond à l'incertitude quant à la localisation de la molécule individuelle. La précision de pointée ( $\sigma$ ) est d'autant meilleure que le nombre de photons collectés ( $N$ ) par molécule individuelle est important. Ces deux quantités sont reliées par la relation :  $\sigma \approx \frac{1}{\sqrt{N}}$  où  $N$  représente le nombre de photons recueillis par molécule et  $\sigma$  représente la largeur de la gaussienne et donc la précision de pointée (Cheezum et al., 2001).

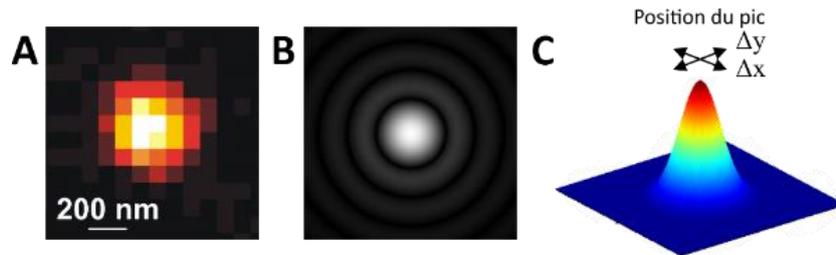


Figure 57 | Localisation des molécules individuelles par ajustement gaussien-2D.

(A) Signal basse résolution d'une molécule individuelle. (B) La diffraction du signal d'une molécule unique donne un point lumineux diffracté appelé tâche d'Airy. (C) Les coordonnées  $x$  et  $y$  d'une molécule individuelle, à un instant donné, sont dérivées de la position centrale de son profil d'intensité ajusté par une fonction gaussienne bidimensionnelle. Il est donc possible d'obtenir une précision de positionnement très inférieure à la résolution optique.

Source : Les images B et C proviennent de wikipédia

### Localisation par ondelettes

Une autre méthode utilise des algorithmes de segmentation par ondelettes développés pour la détection des molécules individuelles et la localisation de leur centroïde. Cette segmentation permet de mettre en évidence les différents niveaux de détails de l'image. En effet, les images originales sont décomposées en ondelettes plus ou moins dilatées, permettant d'obtenir les différents niveaux de détails présents dans l'image. Le premier niveau contient le bruit d'acquisition ; le second niveau contient le signal des molécules individuelles fluorescentes et le troisième niveau contient le bruit de fond intrinsèque à l'image. Un seuil est ensuite appliqué au second niveau permettant la création d'un masque spatial dont le centroïde détermine la position des molécules individuelles. Les avantages de l'approche par ondelette sont triples : (1) la décomposition en ondelettes permet de réduire le temps de calcul des centroïdes des molécules individuelles (Cheezum et al., 2001; Izeddin et al., 2012) ainsi (2) qu'une très bonne précision de localisation contrairement aux autres algorithmes de traitement rapide proposés pour les analyses de PALM (Henriques et al., 2010) et (3) permet la détection des molécules individuelles ayant un rapport signal sur bruit faible car la localisation est indépendante du bruit (plan d'ondelette différent).

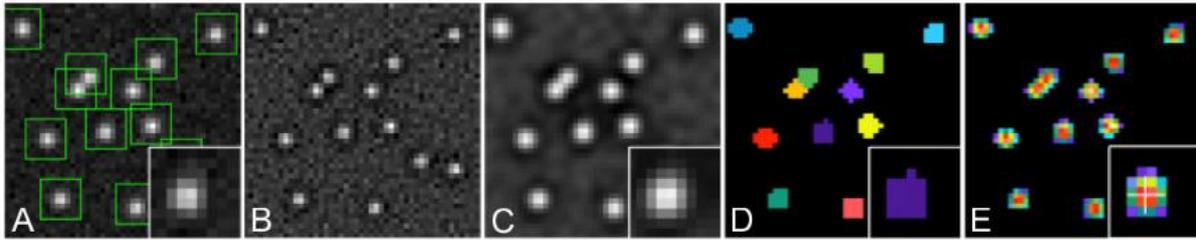


Figure 58 | Localisations de molécules individuelles.

(A) Image source des molécules individuelles détectées (encadré vert). (B) 1<sup>er</sup> plan d'ondelette. (C) 2<sup>ème</sup> plan d'ondelette. (D) Image segmentée : suppression du bruit et identification des molécules individuelles par création d'un masque spatial. (E) Localisation du centroïde sur l'image segmentée pour chaque molécule individuelle.

Source : Adaptée de Izeddin et al., 2012

#### 2.4.4.2. Reconstruction des trajectoires

Grâce au couplage de suivi de molécules individuelles (spt, pour *single particle tracking*) à la technique du PALM, il est possible de suivre des molécules individuelles dans le temps, apportant ainsi des informations dynamiques sur des dizaines de milliers de trajectoires dans les cellules vivantes (Manley et al., 2008). L'acquisition des images en sptPALM est très rapide (50Hz soit une acquisition toutes les 20 ms) permettant ainsi de suivre les positions de chaque molécule individuelle dans le temps et de reconstruire leur trajectoire en reconnectant chaque localisation. Ainsi d'une image à l'autre, si une molécule individuelle ne se déplace pas de plus d'une certaine distance entre deux images successives (3 pixels soit 321 nm dans notre étude) ces deux points sont reliés. Une trajectoire prend fin lorsque le fluorophore photoblanchi ou quitte le plan d'illumination TIRF. La reconstruction des trajectoires permet de représenter l'ensemble des trajectoires également en super résolution (Figure 59).

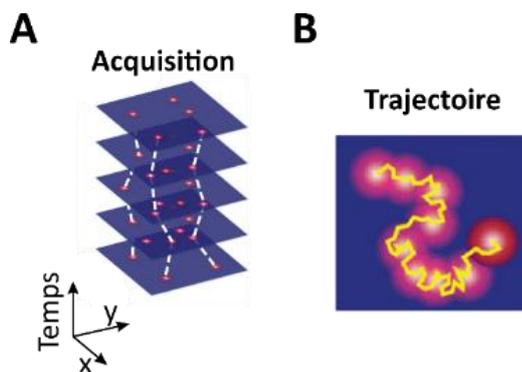


Figure 59 | Principe de la reconstruction des trajectoires par suivi de molécule individuelle.

(A) Lors de l'acquisition, une série d'images est prise, contenant un nombre restreint de molécules marquées (points rouges). Les films contiennent plusieurs milliers d'images. Dans l'étape de localisation, l'image de fluorescence à un moment donné est analysée pour récupérer les positions des molécules. Après avoir répété l'étape de localisation sur une série temporelle d'images, les positions moléculaires des images successives sont reliées (pointillés blancs), en se basant sur une distance de diffusion maximale autorisée, pour générer des trajectoires qui suivent le mouvement des molécules individuelles (B).

Source : Adaptée de Manzo and Garcia-Parajo, 2015

#### 2.4.4.3. Suivi de particules uniques

Une fois les reconnections entre les différentes détections effectuées, l'étude des différents comportements de diffusion des protéines est permise par le calcul du déplacement quadratique

moyen (MSD pour Mean Square Displacement). Le MSD représente la surface explorée par une molécule au cours du temps ( $\Delta t$ ), en deux dimensions. Il est possible d'estimer le MSD d'une molécule en calculant la moyenne de ses déplacements au carré en fonction du nombre de pas de temps. Le premier point du MSD est ainsi calculé à partir des déplacements associés à un pas de temps ( $\Delta t_1 = 1 \cdot \Delta t = 20$  ms, traits et points verts), le deuxième point est calculé à partir des déplacements ayant lieu pendant deux pas de temps ( $\Delta t_2 = 2 \cdot \Delta t = 40$  ms, traits et points rouges) enfin, le troisième point considère les déplacements s'effectuant pendant trois pas de temps ( $\Delta t_3 = 3 \cdot \Delta t = 60$  ms, trait et point bleu) et ainsi de suite pour les points suivants (Figure 61A, B). On remarquera que l'estimation du MSD est d'autant meilleure que le nombre de déplacements considérés est important. Pour cette analyse il est important d'utiliser des trajectoires relativement longues i.e. possédant un grand nombre de pas. En effet dans ce cas, la moyenne des déplacements au carré s'effectue en considérant un grand nombre de déplacements ce qui permet de réduire l'incertitude quant à l'estimation de la MSD. Les derniers points de la MSD (qui considèrent des pas de temps importants) ne considèrent qu'un faible nombre de déplacements de sorte que l'incertitude est importante. Ces derniers points de la MSD ne sont donc souvent pas considérés par les algorithmes (Saxton and Jacobson, 1997).

Trois types de mouvements peuvent être caractérisés : (1) les mouvements browniens, représentés par une courbe linéaire du MSD, (2) dirigés, représentés par une courbe parabolique du MSD et (3) confinés représentés par une courbe atteignant un plateau, qui dépend des propriétés géométriques de la région de confinement. Les molécules ayant un mouvement brownien diffusent librement, celles ayant un mouvement dirigé diffusent et se déplacent à vitesse constante dans une direction préférentielle et celles ayant un mouvement confiné diffusent dans un espace limité, de sorte que les déplacements sont contraints, ce qui se traduit par une courbe MSD atteignant un plateau (Figure 61C).

Pour chaque courbe MSD, le **coefficient de diffusion** ( $D$ ) peut être calculé en ajustant les quatre premiers points du MSD à l'aide de l'équation linéaire  $MSD(\Delta t) = 4D\Delta t$  (Figure 61B, D). Ceci fournit un coefficient de diffusion unique par trajectoire. On fait donc l'hypothèse que le comportement de la molécule ne change pas, ce qui ne sera pas toujours le cas pour les trajectoires les plus longues (>500 ms). Cependant, celles-ci représentent une petite minorité des trajectoires en PALM (Figure 67). Ainsi, pour une cellule donnée (ou une condition donnée) grâce aux nombreuses trajectoires, on peut former l'histogramme des coefficients de diffusion. Celui-ci est souvent en échelle logarithmique car les coefficients de diffusion varient sur plusieurs ordres de grandeurs. Il est alors possible de distinguer (éventuellement) plusieurs régimes : diffusif versus immobile (Figure 61D).

Une protéine est considérée comme immobile si sa surface d'exploration, pendant l'intervalle de temps utilisé pour calculer le coefficient de diffusion, est inférieure à la résolution spatiale du système appelée précision de pointée ( $\sigma$ ). La précision de pointée mesure l'imprécision de la localisation (à cause du caractère stochastique de l'émission et la détection des photons émis et du bruit qui biaise la localisation). De sorte que les détections associées à une molécule ne seront pas toujours au même endroit et forment ce qui pourrait s'apparenter à une trajectoire. A cette trajectoire peut être associé un coefficient de diffusion. Le  $D_{\text{threshold}}$  peut être calculé à partir de l'équation du MSD :

$$D_{\text{threshold}} = \frac{\sigma^2}{4 \times 4 \times \Delta t} = \frac{MSD(0)}{4 \times 4 \times 0.020}$$

La précision de pointée ( $\sigma$ ) pour chacun des systèmes a été obtenue par mesure de la diffusion de molécules de dyn1-mEos3.2 dans des cellules fixées. Pour les expériences de sptPALM sur NIH-3T3, la précision de pointée du système (Olympus IX71, une caméra) est de 62 nm (en moyenne) donc toutes les protéines ayant un D inférieur à  $0.012 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\log(D) = -1.92$ ) sont considérées comme immobiles. Pour les expériences de sptPALM sur MEF, la précision de pointée du système (Olympus IX71, deux caméras) est de 42 nm (en moyenne) donc toutes les protéines ayant un D inférieur à  $0.0055 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\log(D) = -2.26$ ) sont considérées comme immobiles.

Les données de sptPALM montrent deux comportements diffusifs distincts de la dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique, représentés par une courbe à deux pics, avec une diffusion lente (avant la ligne noire en pointillée) et une diffusion rapide (après la ligne noire en pointillée). Pour obtenir cette séparation biologique des deux comportements, un ajustement non linéaire représentant la somme de deux gaussiennes a été fait sur la distribution des coefficients de diffusion, et la valeur de croisement de ces deux gaussiennes a permis de déterminer la séparation biologique (ligne en pointillée noire, Figure 60) entre les molécules à diffusion lente et à diffusion rapide. Pour les expériences avec les NIH-3T3 cette valeur est de  $0.06 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , soit  $\log(D) = -1.22$  ; et pour les expériences avec les MEF TKO Dynamine, cette valeur est de  $0.028 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , soit  $\log(D) = -1.55$ .

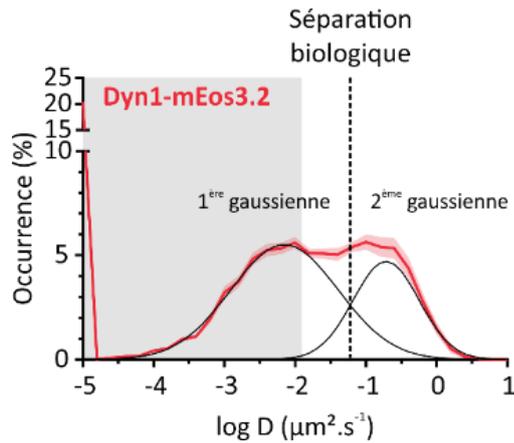


Figure 60 | Représentation des gaussiennes permettant la séparation des deux comportements diffusifs des molécules de dynamine.

Les **coefficients de diffusion instantanées** (Dinst) aussi appelé coefficients de diffusion glissants, peuvent être calculés en considérant des sous trajectoires (de longueur inférieure) d'une trajectoire donnée de molécule individuelle. Ces sous trajectoires sont utilisées pour calculer les déplacements au carré moyen (MSD) qui sont ensuite ajustés pour extraire le coefficient de la sous trajectoire. Dans la mesure où la sous trajectoire est formée au voisinage d'un point, le coefficient de diffusion obtenu permet d'estimer les propriétés de diffusion de la molécule lorsqu'elle se trouvait au voisinage de ce point. Cette approche permet de calculer les coefficients de diffusion le long de trajectoire et sont donc appelés coefficients de diffusion instantanées. Le Dinst permet d'avoir une information sur la vitesse de diffusion à chaque instant de la molécule unique.

**L'analyse de pas** permet de calculer la distance de déplacement d'une molécule individuelle entre deux détections indépendamment de la longueur de la trajectoire (Das et al., 2015). Cette analyse permet de prendre en compte l'ensemble des trajectoires détectées (sans tenir compte d'un minimum de pas par trajectoire) et donne une information sur la diffusion des molécules en fonction de leur localisation subcellulaire. Ainsi les molécules présentant des petits pas mettent en évidence un comportement diffusif ralenti. A l'inverse, les molécules présentant des pas plus grands mettent en évidence un comportement diffusif plus rapide. L'analyse de pas est intéressante pour l'étude des diffusions au niveau des puits recouverts de clathrine comme nous le verrons dans la partie résultats (Figure 61E, F).

En pratique, dans nos analyses, nous avons utilisé empiriquement des trajectoires d'un minimum de 12 points pour l'étude des MSD, de 8 points pour l'étude des coefficients de diffusion et l'ensemble des trajectoires d'au minimum 2 points pour l'analyse de pas.

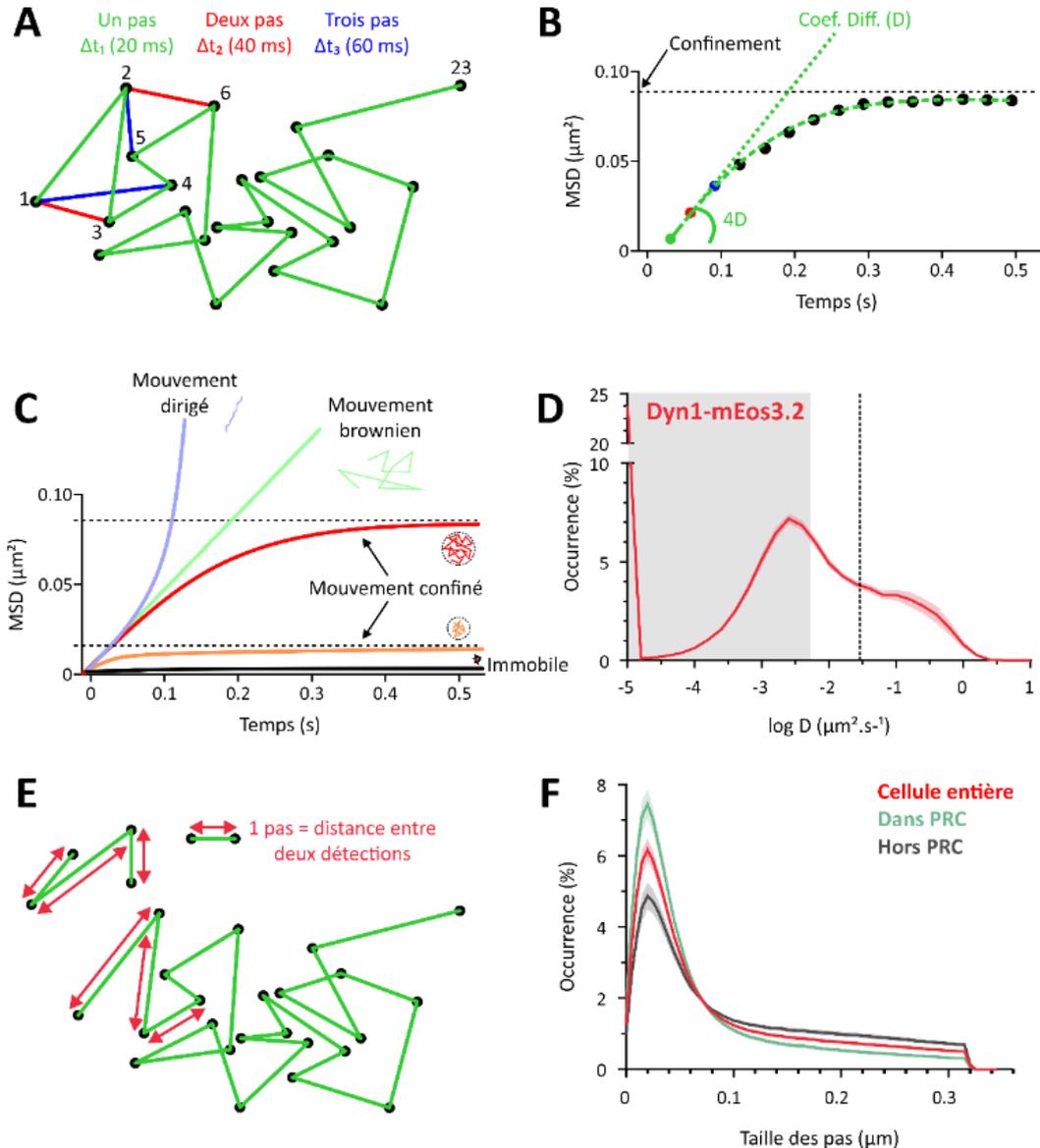


Figure 61 | Analyses de suivie de molécules individuelles.

(A) Trajectoire fictive de 23 points d'une molécule individuelle. Trait vert : pas de 1 entre les points de la trajectoire ; trait rouge : pas de 2 ; trait bleu : pas de 3. (B) Courbe MSD. Le schéma de la trajectoire en (A) montre la distance parcourue entre 2 images (chaque localisation pour chaque image est représentée par un point noir). La moyenne de la distance au carré de chaque pas, au sein de la trajectoire et pour chaque intervalle de temps  $\Delta t$ , donne un point sur la courbe du MSD avec  $\Delta t_1$  de 20 ms en vert,  $\Delta t_2$  de 40 ms en rouge et  $\Delta t_3$  de 60 ms en bleu, ainsi de suite jusqu'à la fin de la trajectoire (sachant que 20 ms est l'intervalle de temps entre chaque acquisition). La courbe de MSD permet d'extraire le coefficient de diffusion (D) qui représente la diffusion globale de la trajectoire. Le coefficient de diffusion (D) est la pente des quatre premiers points de la courbe MSD (ligne pointillée verte). (C) Différents comportements de la courbe MSD. Les trajectoires des molécules individuelles peuvent être immobiles ou confinées (mouvement immobile), diffusives (mouvement brownien) ou dirigées (mouvement dirigé). (D) Histogramme du logarithme décimal des coefficients de diffusion pour une protéine ayant un comportement à la fois immobile et diffusif à la membrane (Dyn1-mEos3.2). (E) Schématisation de trajectoires de différentes longueurs. (F) L'analyse de pas permet de calculer la distance de déplacement d'une molécule individuelle entre deux détections indépendamment de la longueur de sa trajectoire et permet d'apporter une information sur sa diffusion au niveau de domaines subcellulaires, notamment au niveau des puits recouverts de clathrine (PRC) ou les pas sont plus courts qu'à l'extérieur des PRC.

Source : Figures de A à D adaptée de Chazeau, 2012.

#### 2.4.4.4. Tri des trajectoires en fonction de leur localisation

L'accumulation de protéines dans les PRC dans chacun des films a été détectée par l'utilisation d'une routine Metamorph appelée MIA (pour Multidimensional Image Analysis) développée par V. Racine et J-B. Sibarita (Institut Curie, Paris) utilisant la segmentation d'images par ondelettes, pour détecter automatiquement ces accumulations de protéines à la membrane et dans les vésicules, appelés « objets » (« Analyses d'image de sptPALM » p129). Les masques binaires de la segmentation des PRC sont alors utilisés dans une routine Matlab développé par D. Perrais, afin de discriminer les détections ayant lieu à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des PRC, nous permettant d'obtenir une classification des trajectoires de chacune des molécules selon leur localisation par rapport aux PRC.

### 2.5. Mesure de l'internalisation de la transferrine

#### 2.5.1. Marquage des cellules

Les cellules NIH-3T3 ont été affamées dans du milieu HBS (Tableau 3) préchauffé, pendant 10 min à 37°C, puis incubées dans du milieu HBS en présence de l'inhibiteur de la dynamine, le dyngo-4a (ab120689, Abcam) à différentes concentrations (0.05 ; 0.1 ; 0.5 ; 1 ; 3 ; 10 ; 30 ; 50 ; 100 µM) pendant 5 min à 37°C pour inhiber l'endocytose cellulaire. En condition contrôle, les cellules ont été incubées en présence de DMSO car le dyngo-4a a été resuspendu dans ce solvant. Les cellules ont été de nouveau incubées dans du milieu préchauffé HBS contenant le dyngo-4a et de la transferrine couplée à un fluorophore Alexa 568 (Tfn-A568, 10µg/mL, Thermo Fischer) pendant 5 min à 37°C. La transferrine-A568 est le ligand du récepteur à la transferrine constitutivement endocyté par la voie clathrine dépendante. Les cellules ont ensuite été rincées avec de l'HBS froid, puis avec une solution tampon glycine (100 mM NaCl, 50 mM glycine, pH 3, 300 mOsm/L) pendant 2 min sur la glace. Le tampon glycine permet de décrocher/retirer la Tfn-A568 résiduelle, de la membrane cellulaire. Puis les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4% pendant 15 min à l'abri de la lumière. Enfin les cellules ont été rincées plusieurs fois dans du PBS et montées sur lame de microscope (RS France) avec un milieu de montage contenant du DAPI (DAPI Fluoromount-G, SouthernBiotech).

#### 2.5.2. Description du poste et de l'acquisition

Les acquisitions sont réalisées avec le logiciel Metamorph (Molecular Device) avec un microscope inversé (Leica DMI6000 B) placé dans un caisson thermostaté à 37°C muni d'un système d'auto-focalisation (Hardware autofocus - AFS). Les images ont été obtenues avec un objectif à huile HCX PL APO CS 63x (ouverture numérique : 1,4) et à l'aide d'une caméra EMCCD (Photometrics Quantem 512). Une série d'acquisition de 21 images séparées de 0.5 µm, en z, englobant la partie inférieure adhérente

à la lamelle jusqu'au-dessus de la cellule a été réalisée, tout en maintenant les paramètres d'acquisition et la puissance des lasers pour l'ensemble des conditions.

### 2.5.3. Analyse

Pour la quantification de l'endocytose de la Tfn-A568, une projection maximale en z de l'ensemble des acquisitions pour chaque cellule a été réalisée. Ensuite un masque, ainsi qu'une sélection de région de fond sans cellule ont été produits pour chaque cellule. Les vésicules d'endocytose ont alors été détectées par segmentation des images en ondelettes. Pour chaque cellule, nous avons calculé la fluorescence moyenne, le nombre de clusters et la surface cellulaire. Ces données ont été normalisées à 100 pour la condition contrôle (sans inhibiteur dyngo-4a) pour chacune des expériences réalisées sur 4 expériences indépendantes.

## 2.6. Statistiques

Toutes les données ont été soumises à des tests de normalité Agostino-Pearson. Quand le résultat de ce test de normalité était positif (distribution normale), les tests statistiques utilisés furent des t-tests ou des Anova une voie. Quand le résultat du test de normalité était négatif (distribution non normale), les tests statistiques utilisés furent des Mann-Whitney pour comparer les rangs ou des Kolmogorov-Smirnov pour comparer les distributions cumulatives ou encore des tests Kruskal-Wallis. L'ensemble des tests statistiques furent réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7. Les valeurs  $P$  correspondantes sont indiquées comme suit : ns :  $P > 0,05$  ; \* :  $0,01 < P < 0,05$  ; \*\* :  $0,001 < P < 0,01$  ; \*\*\* :  $0,0001 < P < 0,001$  ; \*\*\*\* :  $P < 0,0001$ .



# Résultats

L'EDC est la voie principale utilisée par les cellules pour l'internalisation de récepteurs. Quarante ans d'études en microscopie électronique, en génétique et en biochimie ont permis de décrire le modèle canonique connu aujourd'hui (« L'Endocytose Dépendante de la Clathrine » p45). Néanmoins la compréhension de l'organisation spatiale et temporelle de chacune des protéines impliquées dans ce phénomène reste difficile à étudier. Le développement du protocole de ppH a été crucial afin d'étudier la dynamique de recrutement des protéines de l'endocytose en fonction des événements de scission des vésicules. Ainsi l'analyse du profil de recrutement des protéines permet de mettre en évidence l'organisation modulaire de ce mécanisme mais aussi les profils de recrutement de protéines (Taylor et al., 2011). De plus, l'ensemble des données obtenues à l'aide du protocole ppH couplé à la microscopie TIRF permet d'obtenir la carte temporelle de haute résolution des derniers stades de formation d'une vésicule. Comme décrit précédemment, la dynamine est une protéine essentielle pour la formation des vésicules d'endocytose. Toutefois, le recrutement de la dynamine et son organisation fonctionnelle pour la scission des PRC sont encore aujourd'hui très discutés dû aux différentes études utilisant des techniques *in vitro* ou des modèles cellulaires fixés (« Les différents modèles de scission » p85). Mon travail de thèse a pour but d'améliorer la compréhension du mécanisme de scission vésiculaire par la dynamine dans un modèle *in vivo* en profitant du protocole ppH établi au sein du laboratoire et ainsi de valider ou de réfuter certains modèles discutés à ce jour.

## 1. Recrutement séquentiel de la dynamine aux PRC

### 1.1. Le protocole ppH est une technique d'imagerie quantitative sur cellules vivantes comparables à la technique conventionnelle d'internalisation de la Tfn

Afin de mieux comprendre le rôle de l'oligomérisation de la dynamine pour son recrutement et son fonctionnement, j'ai utilisé le dyngo-4a, un inhibiteur spécifique de la scission par la dynamine (Mccluskey et al., 2013). Je me suis d'abord assurée que l'utilisation du protocole ppH pour suivre l'endocytose du TfR pouvait être corrélée à la technique d'internalisation de la Tfn qui est la technique de référence pour évaluer l'EDC. La Tfn se lie sur le TfR qui est ensuite internalisé par EDC. Cette internalisation de Tfn dépend entièrement de la fonction normale de la dynamine (Ferguson et al., 2009). Ainsi l'internalisation de la Tfn ou du TfR peuvent donc être considérés comme des indicateurs de l'EDC. Pour la calibration de l'effet du dyngo-4a sur l'internalisation de la Tfn, les cellules NIH-3T3 ont été incubées à 37°C pendant 5 minutes avec une solution de HBS, puis incubées pendant 10

minutes avec du dyngo-4a et 10 µg/ml de Tfn-A568 pendant les 5 dernières minutes. Les cellules ont ensuite été rincées avec une solution acide à 4°C pour éliminer la Tfn-A568 non liée, puis fixées (Figure 62A). Les résultats montrent que dans les cellules contrôles, la Tfn-A568 est internalisée et se retrouve dans des vésicules d'endocytose (Figure 62B), tandis que dans les cellules traitées avec le dyngo-4a, l'inhibition de l'internalisation de la Tfn est d'autant plus importante que la concentration de dyngo-4a est grande (Figure 62B, C). L'inhibition de l'internalisation de la Tfn-A568 est dépendante de la concentration de dyngo-4a avec une  $IC_{50}$  de 30,8 µM (Figure 62C), similaire à celui obtenu sur les cellules U2OS dans les mêmes conditions expérimentales (Mccluskey et al., 2013).

Le protocole ppH permet d'étudier l'EDC par la détection et la quantification de la formation de vésicules d'endocytose contenant le TfR-SEP avec une résolution temporelle de ~2 secondes sur cellules vivantes (Merrifield et al., 2005; Perrais and Merrifield, 2005; Taylor et al., 2011). Afin de savoir si cette technique développée au sein de notre laboratoire est comparable avec les résultats décrits précédemment, j'ai transfecté des cellules NIH-3T3 transitoirement avec le TfR-SEP. Le TfR-SEP a été utilisé comme marqueur des PRC car ce récepteur est connu pour être endocyté par la voie de l'EDC (Merrifield et al., 2005). Les cellules ont été d'abord perfusées 5 min avec une solution de HBS (période de contrôle), puis pendant 10 min avec l'inhibiteur dyngo-4a à différentes concentrations. Les cellules ont ensuite été lavées pour rincer l'inhibiteur, puis de nouveau imagées pendant 10 minutes. Les images ont été acquises par microscopie TIRF pendant le protocole ppH. Après détection automatique et vérification des évènements détectés, le nombre d'évènements d'endocytose a été mesuré pour chaque cellule au cours du temps (Figure 62E) et une courbe dose-réponse de la fréquence normalisée des évènements d'endocytose à chaque concentration de dyngo-4a a été obtenue. Plus la concentration en dyngo-4a est importante et plus la formation de vésicule est inhibée, avec un  $IC_{50}$  de 43,5 µM (Figure 62F). Pour vérifier que les méthodes de mesure de l'EDC, internalisation de Tfn et ppH, rendent bien compte de la même inhibition par le dyngo-4a, j'ai effectué un test statistique Anova 2 voies. Ce test statistique montre que la concentration d'inhibiteur est une source de variation pour la mesure de l'endocytose ( $p < 0.0001$ ) tandis que la méthode de mesure de l'EDC n'influence pas les résultats obtenus. Ainsi, la technique de ppH est une technique comparable à celle de l'internalisation de la Tfn pour l'étude de l'endocytose et de sa perturbation.

Le protocole ppH permet donc une mesure quantitative de l'EDC. Il a de plus l'avantage de permettre l'étude du phénomène d'endocytose sur des cellules vivantes et de pouvoir cartographier dans l'espace et le temps l'ensemble des vésicules d'endocytose formées avec une résolution temporelle de deux secondes, représentant ainsi un atout indéniable pour l'étude de l'EDC.

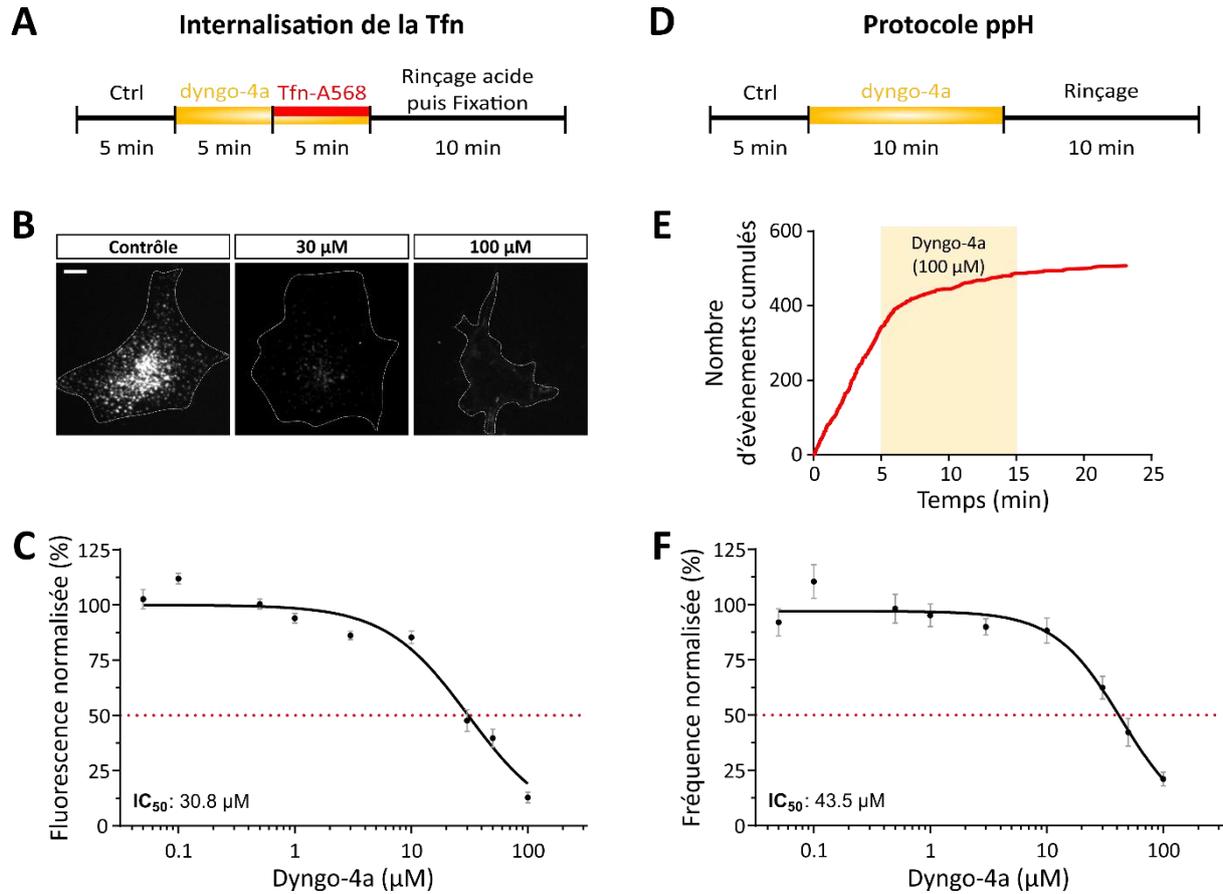


Figure 62 | Comparaison internalisation de la Tfn et protocole ppH.

(A) Protocole d'internalisation de la Tfn. Ctrl, Contrôle. (B) Images représentatives de cellules NIH-3T3 selon le protocole (A) avec les concentrations indiquées de dyngo-4a. Le contour cellulaire est délimité par un trait blanc. Barre d'échelle, 5  $\mu\text{m}$ . (C) Courbe dose-réponse de la fluorescence de Tfn-A568 internalisée en fonction de la concentration de dyngo-4a. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes (0.05  $\mu\text{M}$ , n = 15 ; 0.1  $\mu\text{M}$ , n = 17 ; 0.5  $\mu\text{M}$ , n = 32 ; 1  $\mu\text{M}$ , n = 30 ; 3  $\mu\text{M}$ , n = 33 ; 10  $\mu\text{M}$ , n = 26 ; 30  $\mu\text{M}$ , n = 31 ; 50  $\mu\text{M}$ , n = 51 ; 100  $\mu\text{M}$ , n = 32). (D) Protocole de ppH. Ctrl, Contrôle. (E) Exemple du nombre d'évènements d'endocytose cumulé enregistrés dans une cellule transfectée avec le Tfn-SEP, avant, pendant (zone orange) et après l'application de 100  $\mu\text{M}$  de dyngo-4a. (F) Courbe dose-réponse de la fréquence d'endocytose en fonction de la concentration de dyngo-4a. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes (0.05, n = 9 ; 0.1  $\mu\text{M}$ , n = 5 ; 0.5  $\mu\text{M}$ , n = 5 ; 1  $\mu\text{M}$ , n = 5 ; 3  $\mu\text{M}$ , n = 5 ; 10  $\mu\text{M}$ , n = 9 ; 30  $\mu\text{M}$ , n = 8 ; 50  $\mu\text{M}$ , n = 10 ; 100  $\mu\text{M}$ , n = 11). Les valeurs en (C) et (F) sont ajustées par une fonction sigmoïde (courbe noire) et possèdent un  $\text{IC}_{50}$  similaire pour les deux techniques : 30,8  $\mu\text{M}$  pour l'internalisation de la transferrine (C) et 43,5  $\mu\text{M}$  pour le protocole de ppH (F).

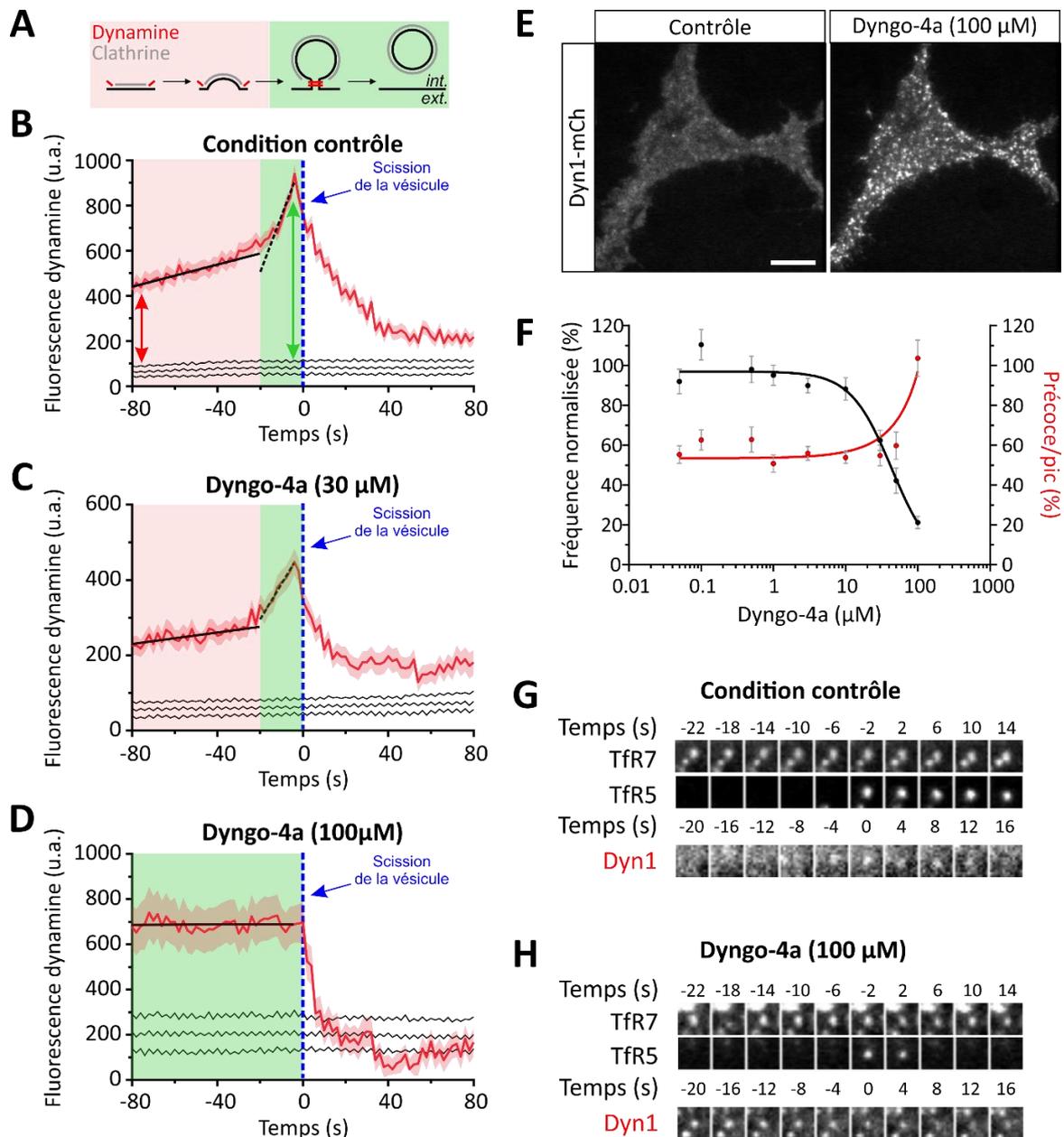
## 1.2. Le recrutement biphasique de la dynamine aux PRC

Après avoir validé que notre technique de ppH est comparable à une technique plus conventionnelle telle que l'internalisation de la Tfn pour l'étude de l'EDC, j'ai procédé à l'analyse de l'effet du dyngo-4a sur la cinétique de recrutement de la dynamine aux PRC dans les cellules vivantes. La fluorescence

moyenne de la dyn1-mCh pour les évènements d'endocytose terminaux illustre son profil de recrutement tout au long de la formation d'une vésicule d'endocytose (Figure 63A, B). Un exemple de détection individuelle en condition contrôle illustre le moment de scission d'une vésicule (temps 0, TfR5) et le recrutement transitoire de la dyn1-mCh avec un pic de recrutement juste avant la scission (Figure 63F). Le moment de scission de la vésicule est distingué par ppH (ligne pointillée bleue). Les molécules de dyn1-mCh sont recrutées aux PRC en deux phases séquentielles, d'abord pendant les premiers stades (phase 1) de la formation des PRC (zone rouge claire, entre -80 et -20 secondes avant la scission) et plus tard (phase 2), de façon plus importante et plus rapide, juste avant la scission de la membrane (zone verte claire, entre -20 et -4 secondes avant la scission) (Figure 63A, B). Après la scission vésiculaire (ligne pointillée bleue), la fluorescence de la dyn1-mCh diminue (Figure 63B). Un ajustement linéaire pour chacune des phases permet d'obtenir une évaluation de la modification du recrutement de la dyn1-mCh (en unité arbitraire de fluorescence, u.a.) en fonction du temps. La pente de l'ajustement de la première phase est de 2.5 u.a./s (ligne noire continue) tandis que la pente de la deuxième phase est de 25 u.a./s (ligne noire pointillée). Ces résultats démontrent que le recrutement de la dynamine précède le moment de la scission vésiculaire, affirmant ainsi son implication dans le processus de scission, et se produit en deux phases : 1) une première phase de recrutement lente qui pourrait sous-tendre un rôle de la dynamine dans la maturation des vésicules et 2) une seconde phase plus rapide permettant sa forte accumulation qui pourrait ainsi contribuer à la scission vésiculaire.

L'application de dyngo-4a modifie le profil de recrutement de la dyn1-mCh, avec une forte accumulation pendant la phase précoce (Figure 63C-E). En effet, l'exemple de détection individuelle en présence de la concentration maximale de dyngo-4a montre que la dyn1-mCh est visible bien avant la scission (Figure 63H). Un ajustement linéaire a également été réalisé pour les deux phases de recrutement en présence de 30  $\mu$ M de dyngo-4a. La pente de l'ajustement de la première phase est de 0.8 u.a./s (ligne noire continue) tandis que la pente de la deuxième phase est de 9.4 u.a./s (ligne noire pointillée). En présence de cette concentration de dyngo-4a, la vitesse de recrutement de la dyn1-mCh est ralentie de 68 % pour la phase 1 et de 62 % pour la phase 2. Ce résultat suggère que l'inhibition modérée (30  $\mu$ M) de la dynamine impacte la vitesse de recrutement et de scission de la dynamine pendant les deux phases. Pour la plus forte concentration de dyngo-4a à 100  $\mu$ M, une seule phase de recrutement est observée. Donc un seul ajustement linéaire a été réalisé présentant une valeur de 0.03 u.a./s, signifiant une réduction de 99 % de la vitesse de recrutement de la dyn1-mCh. En conclusion, l'inhibition totale de la dynamine ralentit de façon importante le recrutement de la dynamine jusqu'à perdre la distinction des deux phases. La courbe dose-réponse illustrant la fréquence normalisée décroissante de la formation de vésicules (ligne noire) avec des concentrations croissantes de dyngo-4a (reproduites de la Figure 63 ; condition contrôle : 10.2 évènements/min/cellule, 30  $\mu$ M

dyngo-4a : 6.3 évènement/min/cellule, 100  $\mu\text{M}$  dyngo-4a : 1.6 évènement/min/cellule) et la normalisation de l'état de recrutement précoce par rapport au pic (flèche rouge/flèche verte en A) montrent des quantités plus élevées de dyn1-mCh avec des concentrations plus élevées de dyngo-4a (Figure 63F, courbe rouge). Ces résultats révèlent que même si la dynamine est incapable de couper le cou vésiculaire, elle reste accumulée aux PRC.



*Figure 63 | La dynamine1-mCh s'accumule aux cous des puits recouverts de clathrine après inhibition par le dyngo-4a.*

**(A)** Schéma représentant les différentes étapes de formation d'une vésicule d'endocytose avec le manteau de clathrine (gris) et le recrutement de la dynamine (rouge). **(B)** Fluorescence moyenne de la dyn1-mCh pour les événements terminaux d'endocytose détectés dans 9 cellules différentes, alignée sur le moment de la détection des événements qui correspond à la scission de la vésicule (n = 2297 événements). Les lignes noires représentent la médiane et les limites de confiance (95%) pour les mesures aléatoires de fluorescence. La flèche rouge représente le recrutement précoce des molécules de dyn1-mCh 80 secondes avant la scission de la vésicule (zone rouge claire). La flèche verte représente le recrutement maximum de la dyn1-mCh juste avant la scission de la vésicule (ligne pointillée bleue). **(C)** Fluorescence moyenne de la dyn1-mCh, pour les événements d'endocytose détectés dans 8 cellules différentes, alignée sur le moment de la détection des événements qui correspond à la scission de la vésicule (n = 1265 événements), pendant l'application de dyngo-4a à 30  $\mu$ M. **(D)** Fluorescence moyenne de la dyn1-mCh pour 437 événements terminaux d'endocytose détectés dans 11 cellules, alignée sur le moment de scission des vésicules, pendant l'application de 100  $\mu$ M de dyngo-4a. Des ajustements linéaires des deux phases de recrutement de la dynamine (panels B-D) sont représentés par une ligne noire continue (phase 1) et une ligne noire pointillée (phase 2). **(E)** Illustrations du marquage de la dyn1-mCh aux PRC en condition contrôle et après application de dyngo-4a à 100  $\mu$ M. Barre d'échelle, 5  $\mu$ m. **(F)** Courbe dose-réponse montrant la fréquence normalisée décroissante de la formation de vésicules (ligne noire) et le rapport entre l'accumulation précoce et le pic de recrutement (flèche rouge/flèche verte en A) en fonction de la concentration de dyngo-4a (ligne rouge). Les barres d'erreur représentent la SEM. Les valeurs des deux courbes sont ajustées par des fonctions sigmoïdes (courbe noire pour la fréquence et courbe rouge pour le rapport entre l'accumulation précoce et le pic de recrutement) **(G-H)** Exemples d'événements de scission en condition contrôle (E) et en présence de 100  $\mu$ M dyngo-4a (F).

Nous avons voulu confirmer ce résultat par un autre inhibiteur de l'activité GTPase de la dynamine agissant par un autre mécanisme que le dyngo-4a. Le GTP $\gamma$ S est un analogue non hydrolysable du GTP qui bloque l'activité de la dynamine et induit la formation de longues hélices de dynamine entourant le cou des vésicules en formation (Takei et al., 1995). Injecté dans les cellules par une pipette de patch-clamp, le GTP $\gamma$ S bloque l'endocytose dans les neurones (Jockusch et al., 2005; Yamashita et al., 2005b). De plus, il existe un composé photo-activable, le DMNPE-GTP $\gamma$ S, qui, après illumination par une lumière ultraviolette (365 nm), se décompose en GTP $\gamma$ S et permet un blocage de l'activité GTPase de la dynamine qui n'est pas limité par la diffusion de la molécule.

Des expériences conduites par Morgane Rosendale ont permis de suivre l'EDC avec le ppH tout en dialysant la cellule enregistrée avec une solution permettant de maintenir l'activité d'EDC (« La dialyse cellulaire et l'enregistrement patch-clamp » p109) (Rosendale et al., 2018). Lorsque la solution contient également le DMNPE-GTP $\gamma$ S (4 mM), l'activité d'endocytose n'est pas perturbée après le passage en mode « cellule entière » (Figure 64A). En revanche, après 5 minutes de dialyse, l'illumination pendant 1 s par une fibre couplée à la pipette permettant l'échange de solutions, réduit la fréquence d'apparition des vésicules d'endocytose qui est divisée par 10 en 4 secondes (1.63 événement/4sec avant et 0.14 événement/4 sec après décaageage DMNPE-GTP $\gamma$ S) (Figure 64B). Ce blocage s'accompagne d'une accumulation de la dyn2-mCh aux PRC (Figure 64C, D, courbe rouge

foncée). Cependant cette accumulation est beaucoup plus lente que le blocage de l'EDC : elle démarre après un délai de plusieurs secondes et n'est maximale qu'après 2 minutes. La même expérience a été réalisée avec une solution de dialyse contrôle, et permet de vérifier que l'illumination UV n'a pas d'impact sur le recrutement de la dyn2-mCh à la membrane (Figure 64C, courbe rouge claire). Ces résultats suggèrent que le blocage de la scission conduit à une élongation de l'hélice de dynamine, empêche l'hydrolyse du GTP et par conséquent le désassemblage des molécules de dynamine de cette structure hélicoïdale.

Afin de pouvoir évaluer la quantité de DMNPE-GTP $\gamma$ S décaagée suite à l'illumination UV, j'ai comparé l'inhibition obtenue par décaageage avec l'inhibition du GTP $\gamma$ S non cagé. Les cellules ont été enregistrées pendant le protocole ppH et dialysées avec une solution intracellulaire contenant 0,4 mM de GTP (concentration physiologique en condition contrôle) et différentes concentrations de GTP $\gamma$ S (Figure 64E et F). La concentration croissante de GTP $\gamma$ S montre une inhibition dose-dépendante. La dialyse du GTP $\gamma$ S induit une instabilité du patch cellulaire d'autant plus importante que sa concentration est élevée. Par conséquent, les expériences réalisées avec la plus forte concentration de GTP $\gamma$ S (1 mM) n'ont abouti qu'à l'analyse d'une seule cellule selon les critères établis, décrits dans la partie (« Surveillance des paramètres cellulaires » p112). Ainsi cette calibration permet de déterminer que le décaageage de 4 mM de DMNPE-GTP $\gamma$ S produit une concentration d'au moins 0.1 mM de GTP $\gamma$ S.

L'ensemble des résultats utilisant deux inhibiteurs différents de la dynamine, le dyngo-4a (Figure 63) et le GTP $\gamma$ S (Figure 64), montre que l'activité GTPase de la dynamine contribue à son recrutement rapide aux PRC.

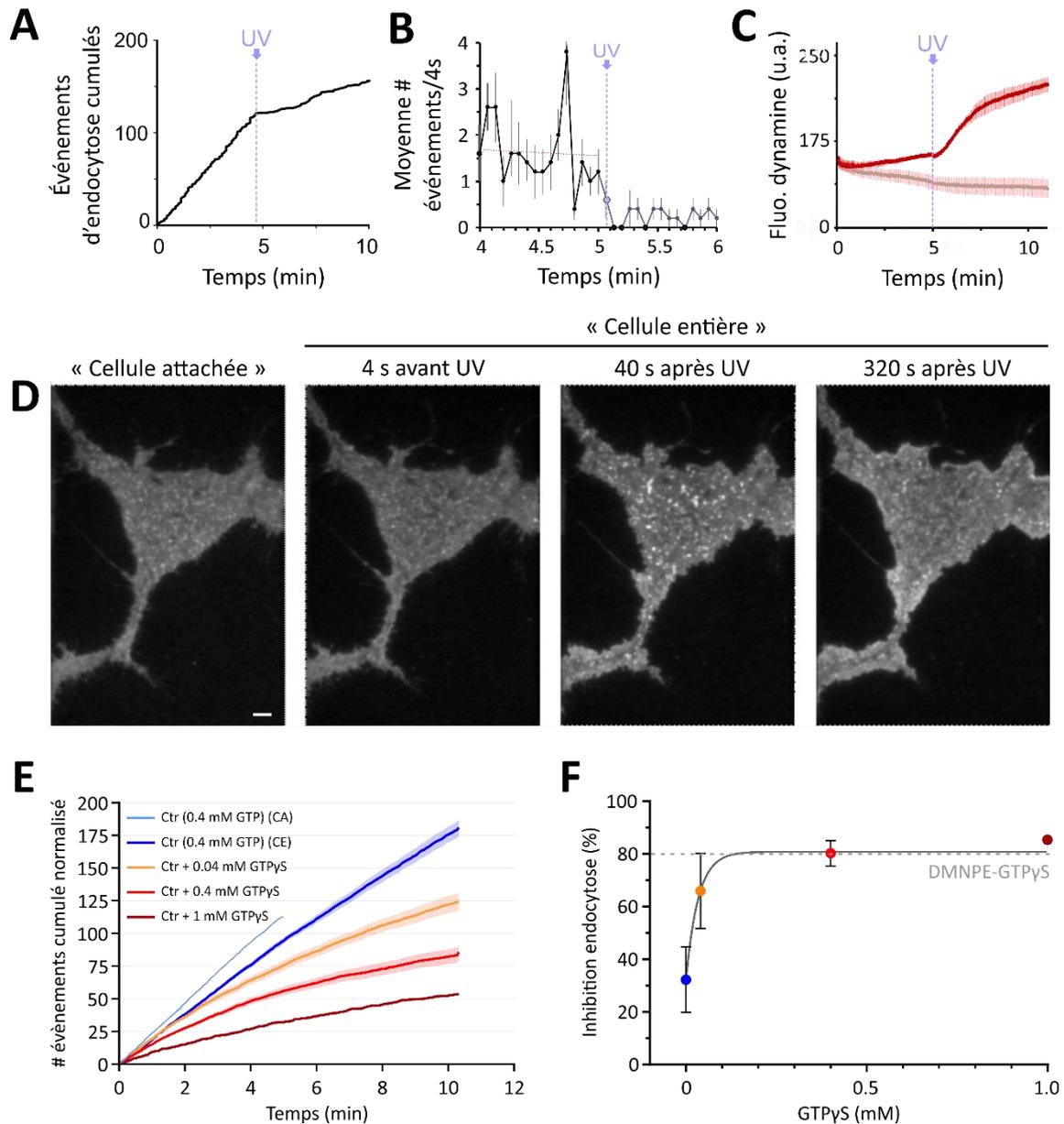


Figure 64 | Le décaage du DMNPE-GTP $\gamma$ S inhibe l'EDC en 4 secondes et entraine l'accumulation de dyn2-mCh aux PRC.

(A) Nombre d'évènements d'endocytose cumulés, détectés avec le protocole de ppH dans les cellules dialysées avec 4 mM de DMNPE-GTP $\gamma$ S avant et après décaage (ligne pointillée mauve « UV » : décaage du GTP $\gamma$ S) (n=5). (B) Nombre moyen d'évènements toutes les 4 secondes avant et après l'illumination UV qui libère le GTP $\gamma$ S. (C) Fluorescence de la dyn2-mCh en configuration « cellule entière » avant et après l'illumination UV, dans les cellules dialysées en présence de DMNPE-GTP $\gamma$ S (ligne rouge foncée) ou de GTP seulement (ligne rouge claire). (D) Cellule NIH-3T3 transfectée avec la dyn2-mCh en configuration « cellule attachée » puis en configuration « cellule entière » dialysée avec une solution intracellulaire contenant 0.4 mM de GTP et 4 mM de DMNPE-GTP $\gamma$ S 4 secondes avant, puis 40 secondes et 320 secondes après une illumination UV (365 nm) qui permet la libération du DMNPE-GTP $\gamma$ S en GTP $\gamma$ S. Barre d'échelle, 5  $\mu$ m. (E) Nombre d'évènements d'endocytose cumulé normalisé détectés avec le protocole ppH normalisée à l'activité d'endocytose basale (courbe bleue claire, n = 12), dans diverses conditions : en dialyse avec une solution intracellulaire contrôle (courbe bleue foncée, n = 12), ou avec des concentrations croissantes de GTP $\gamma$ S (0.04 mM, n = 7 ; 0.4 mM, n = 8 ; 1 mM, n = 1). (F) Pourcentage d'inhibition de l'endocytose pour les différentes concentrations de GTP $\gamma$ S du panel (E) comparé à l'inhibition de 4 mM de DMNPE-GTP $\gamma$ S décaé (ligne pointillée grise). La courbe noire représente un ajustement exponentiel à une phase.

### 1.3. La dynamine est échangée aux PRC même en l'absence d'activité GTPase

Afin de pouvoir effectuer la scission du cou des vésicules d'endocytose, les études *in vitro* et *in cellulo* ont montré par cryo-EM (Kong et al., 2018) et microscopie électronique (Koenig and Ikeda, 1989) la formation d'une hélice de dynamine autour du cou des vésicules. Cette structure hélicoïdale est obtenue par l'oligomérisation de dimères de dynamine. Les expériences précédentes *in cellulo* ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur de la dynamine (dyngo-4a, Figure 63) entraîne une augmentation durable de la fluorescence de la dynamine-mCh aux PRC. Cependant il n'est pas clair si cette augmentation de fluorescence vient de la stabilisation des molécules de dynamine aux PRC.

Pour tester cela, j'ai réalisé une expérience de FRAP sur des PRC individuels en imageant simultanément la dyn1-GFP et la dyn1-mCh co-transfectées dans des cellules NIH-3T3, en condition contrôle et en présence de la plus forte concentration de dyngo-4a testée (Figure 65). En condition contrôle, la fluorescence de la dyn1-mCh revient rapidement à son niveau de fluorescence de base, atteignant un retour de 95 % avec un  $k_{fast}$  de  $\sim 2$  s et un  $k_{slow}$  de 25 s (Figure 65B). Ainsi ces expériences mettent en évidence que la dynamine est réversiblement piégée aux PRC et que les molécules de dynamine ne sont pas immobilisées au sein de cette structure mais plutôt échangées en continu, montrant ainsi pour la première fois le comportement dynamique de la dynamine aux PRC.

En présence de 100  $\mu$ M dyngo-4a, la fluorescence de la dyn1-mCh revient également rapidement, atteignant un retour de 80 % significativement inférieur à la condition contrôle (\*\*\*\* $p < 0.0001$  obtenu avec un test statistique de Student non-apparié), avec un  $k_{fast}$  de  $\sim 2,9$  s et un  $k_{slow}$  de 25 s, non significativement différents du  $k_{fast}$  et  $k_{slow}$  en condition contrôle ( $p = 0.2$  obtenu avec un test statistique de Student non-apparié) (Figure 65C). Ces résultats indiquent que l'inhibition de la scission vésiculaire ne perturbe pas la vitesse d'échange de la dynamine aux PRC, mais entraîne une immobilisation d'une fraction de 15% de molécules de dynamine aux PRC. Le dyngo-4a permet de figer une fraction de molécules de dynamine, ce qui serait cohérent avec la formation d'une hélice stable.

En conclusion la dynamine est échangée tout au long de son recrutement aux PRC et ne s'immobiliserait que lorsqu'elle est engagée dans une structure hélicoïdale.

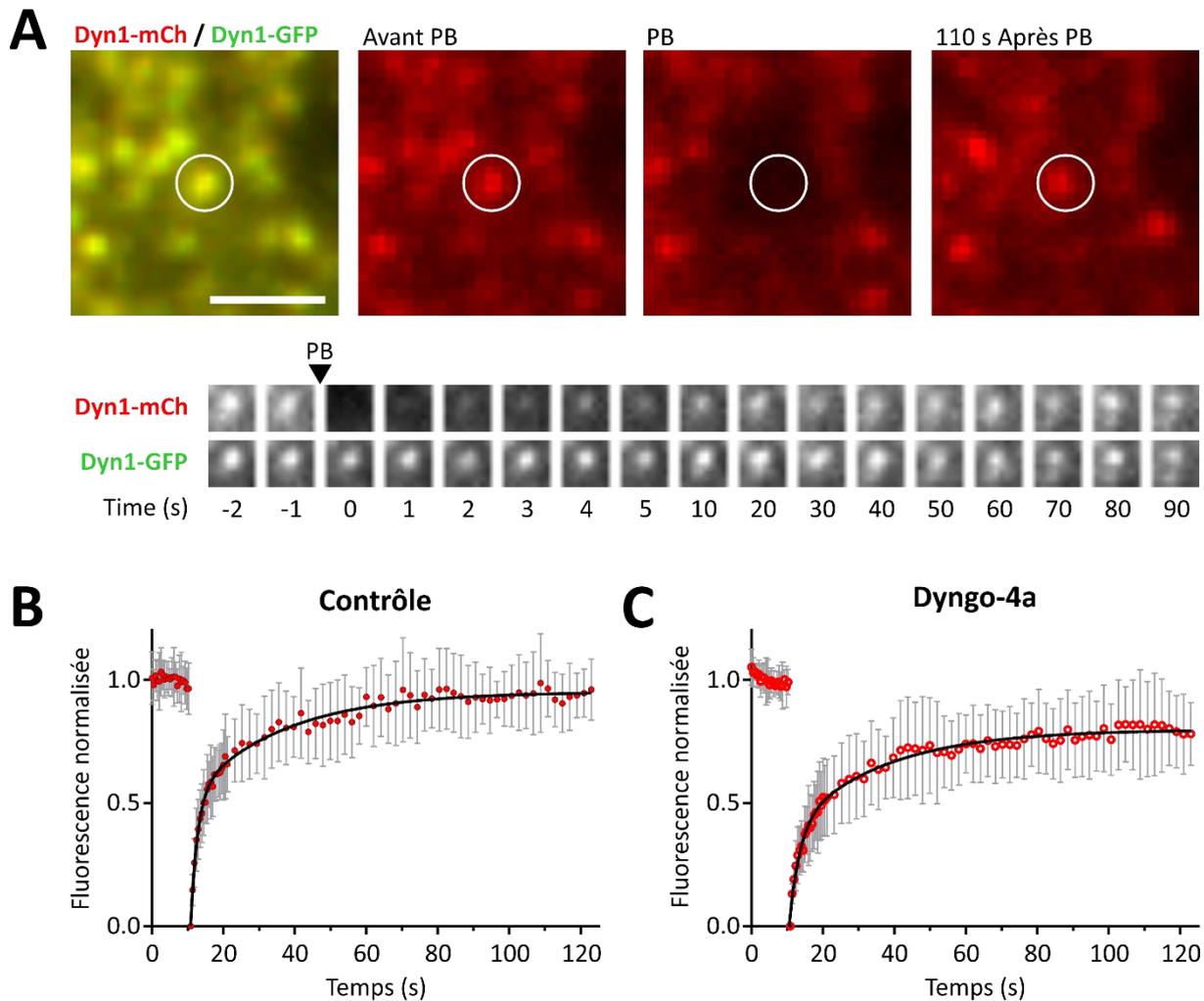


Figure 65 | La dynamine1-mCh est réversiblement piégée aux PRC.

**(A)** Image représentative d'une expérience de FRAP (haut) et montage de la région d'intérêt (PRC) photoblanchie (bas) montrant les phases de pré-blanchiment (Avant PB), de photoblanchiment (PB) et de récupération de la fluorescence de la dyn1-mCh dans des cellules NIH-3T3 (après PB). Barre d'échelle, 2  $\mu$ m. **(B-C)** Profils de récupération de fluorescence moyenne de la dyn1-mCh en condition contrôle (B, n = 17 PRC, 17 cellules de 3 expériences indépendantes) et en présence de dyngo-4a (100 $\mu$ M) (C, n = 12 PRC, 12 cellules de 3 expériences indépendantes). Les barres d'erreur indiquent la déviation standard (SD). Les courbes noires en (B et C) représentent des ajustements exponentiels à deux phases.

## 2. Diffusion des molécules uniques de dynamine

### 2.1. La dynamine est recrutée et diffuse à la membrane plasmique

Les expériences de FRAP ont permis d'apporter une nouvelle notion importante sur la dynamique d'échange de la dynamine aux PRC dans les cellules vivantes. Cependant, cette technique ne permet l'étude qu'à l'échelle d'une population de protéines et ainsi les résolutions temporelle et spatiale restent limitées. Afin d'étudier de façon plus précise le comportement diffusif des molécules de dynamine aux PRC dans les cellules vivantes, j'ai utilisé une technique de suivi de protéines individuelles, le sptPALM.

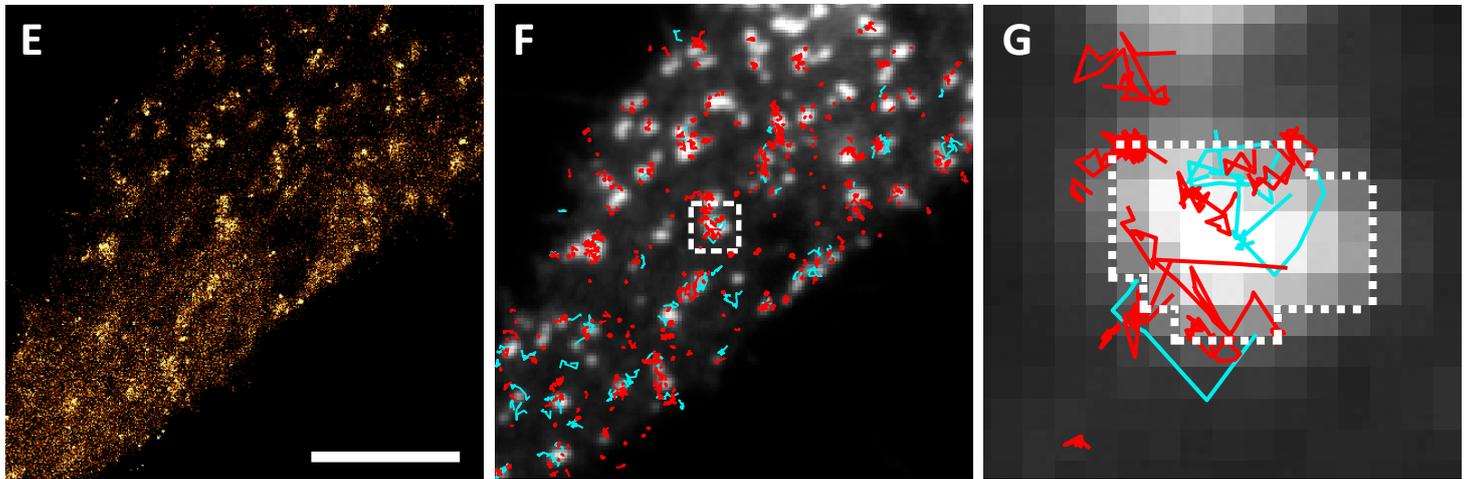
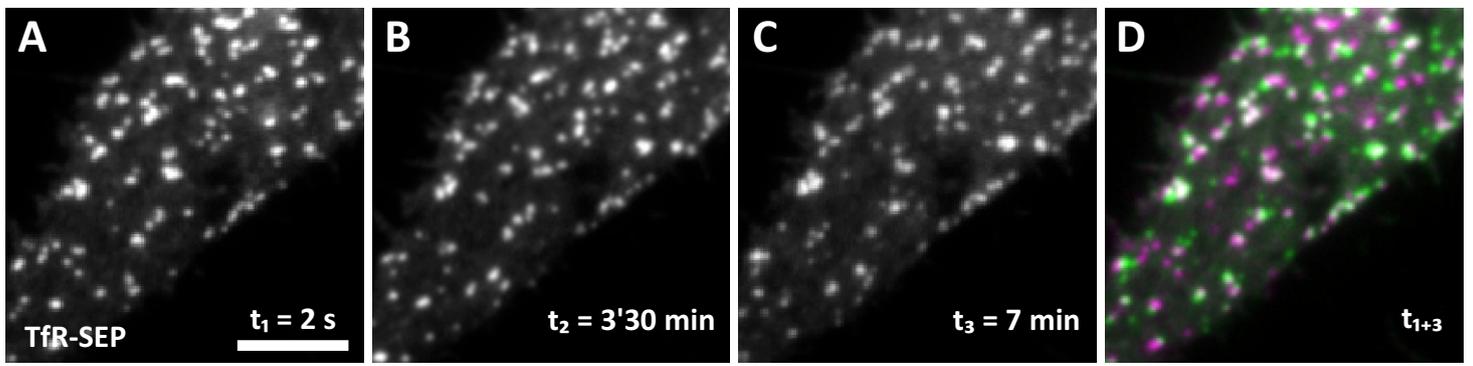
Pour réaliser ces expériences j'ai transfecté des cellules NIH-3T3 avec le TfR-SEP et la dyn1-mEos3.2. Le TfR-SEP présente un marquage faible et diffus à la membrane plasmique mais beaucoup plus intense et agrégé aux PRC (Figure 66A-D). Les PRC sont des structures labiles qui apparaissent puis disparaissent suite à l'endocytose du TfR-SEP au cours du temps. Ceci est démontré par les images A à C de la Figure 66 qui représentent la distribution des agrégats de TfR-SEP au cours de l'enregistrement, mais aussi par la Figure 66D où l'on peut voir en magenta les PRC au début de l'enregistrement et en vert les PRC à la fin de l'enregistrement. Les images d'intensité super résolues de sptPALM obtenues à partir des cellules vivantes ont mis en évidence le recrutement de la dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique et montrent une distribution fortement non uniforme de la dyn1-mEos3.2 dans différentes régions subcellulaires (Figure 66E). La reconnexion de la localisation des molécules individuelles de dyn1-mEos3.2 des images séquentielles a permis de reconstituer les trajectoires des molécules de dyn1-mEos3.2 individuelles à la membrane plasmique (Figure 66F, G) et de représenter la distribution des coefficients de diffusion (Figure 66H). Le nombre de pas par trajectoire des molécules individuelles de dyn1-mEos3.2 varie entre 2 et 30 (Figure 66K), ce qui correspond à des trajectoires d'au plus 600 ms. Cette distribution reflète la cinétique de photo blanchiment des molécules individuelles mais également la cinétique de liaison de la dynamine à la membrane où elle sera détectée.

Une protéine est considérée comme immobile si sa surface d'exploration est inférieure à la précision de pointée. Dans cette expérience la précision de pointée, déterminée sur des cellules fixées, est de 62 nm, soit ( $\log(D) = -1.92$ ). Ainsi toutes les molécules de dyn1-mEos3.2 ayant un coefficient de diffusion inférieur ou égal à  $0.012 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , ( $\log(D) = -1.92$ ) sont considérées comme immobiles (zone grise Figure 66H et I). Les données de sptPALM montrent deux comportements diffusifs distincts de la dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique, représentés par une courbe à deux pics, avec une diffusion lente (avant la ligne noire en pointillée ; 69 % des molécules détectées) et une diffusion rapide (après la ligne noire en pointillée ; 31 % des molécules détectées) avec un coefficient de diffusion moyen de  $0.18 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , ( $\log(D) = 1.51$ ) ce qui correspond aux propriétés de diffusion rapide d'une protéine ancrée aux lipides du feuillet interne de la membrane plasmique (Rossier et al., 2012) (Figure 66H, J). Ces résultats permettent de mettre en évidence que la dynamine peut être recrutée à la membrane plasmique et y diffuser même si celle-ci est une protéine cytosolique. Les deux populations de diffusion observées pourraient correspondre à des molécules de dyn1-mEos3.2 localisées dans des domaines membranaires différents.

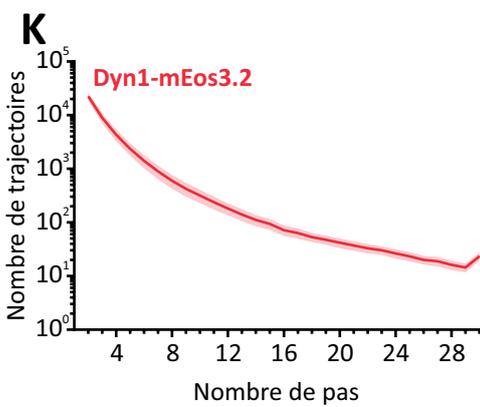
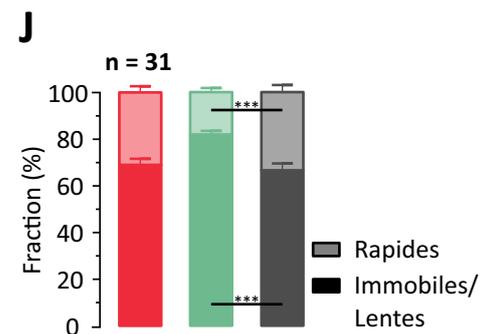
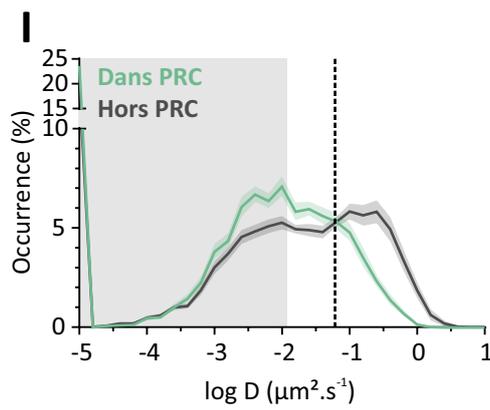
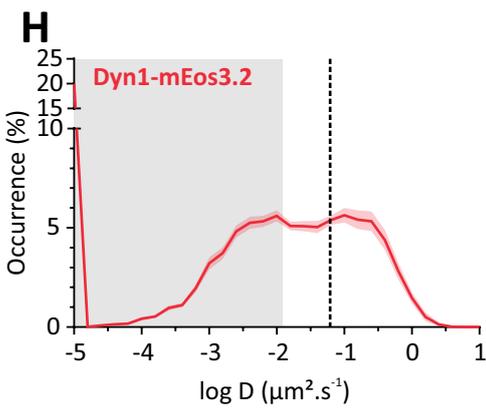
Compte tenu du recrutement de la dynamine aux PRC, j'ai comparé les comportements diffusifs de la dyn1-mEos3.2 à l'intérieur et à l'extérieur des PRC qui montrent une augmentation significative de la

population de molécules à diffusion lente et immobile au sein des PRC (82 % de diffusions lentes pour 18 % de diffusions rapides à l'intérieur des PRC versus 66 % de diffusions lentes et 34 % de diffusions rapides à l'extérieur des PRC) (Figure 66I, J). Afin de s'assurer que la détection des molécules de dyn1-mEos3.2 est liée à un recrutement membranaire de la protéine et non pas à une diffusion stochastique de cette protéine à la membrane plasmique, une expérience contrôle avec des cellules co-exprimant le TfR-SEP et la mEos3.2 cytosoluble a été réalisée. Aucune détection de la mEos3.2 cytosoluble à la membrane plasmique n'a été obtenue, ce qui indique que la détection de la dyn1-mEos3.2 est spécifique de son recrutement et de sa diffusion à la membrane plasmique (résultats non illustrés).

L'ensemble de ces données démontrent que les molécules de dyn1-mEos3.2 sont recrutées et diffusent à la membrane plasmique mais aussi qu'elles diffusent plus lentement à l'intérieur des PRC qu'à l'extérieur, suggérant ainsi une immobilisation des molécules de dyn1-mEos3.2 aux PRC.



■ Immobiles/Lentes ■ Rapides



*Figure 66 | La dynamine1-mEos3.2 est recrutée et diffuse à la membrane plasmique dans les NIH-3T3. (A-D) Image d'une cellule NIH-3T3 exprimant le TfR-SEP qui marquent les PRC à l'instant t<sub>1</sub> (A), t<sub>2</sub> (B), t<sub>3</sub> (C) et la superposition de t<sub>1</sub> (magenta) et t<sub>3</sub> (vert) (D). (E) Image d'intensité super-résolue de la dyn1-mEos3.2 (WT) obtenue par sptPALM à partir d'une séquence de 36 000 images de molécules uniques de la mEos3.2 photoconverties dans le canal rouge (50 Hz, durée 12 min). (F) Image des trajectoires de plus de 8 images (160 ms) de molécules individuelles de dyn-1-mEos3.2 photoconverties. Les trajectoires correspondantes sont codées en couleur pour indiquer leur vitesse de diffusion : diffusion  $\leq 0.06 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  ( $\log(D) = -1.22$ , diffusion lente/immobiles, rouge) et  $\geq 0.06 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  (diffusion rapide, cyan) (2432 trajectoires pour cette cellule). La ligne en pointillée noire représente la séparation biologique entre les deux populations distinctes de molécules. (G) Représentation d'un PRC et des trajectoires avec un grossissement plus élevé de la zone délimitée en (F). Barres d'échelle en (A) et (E), 5  $\mu\text{m}$ . (H, I) Distribution moyenne des coefficients de diffusion ( $\log D$ ) de la dyn1-mEos3.2 à la surface des cellules (H), à l'intérieur (vert clair) et à l'extérieur (gris foncé) des PRC (moyenne  $\pm$  SEM) (I) (n = 31 cellules pour 4 expériences indépendantes) (moyenne  $\pm$  SEM). Les zones grises incluant les valeurs de diffusion inférieures à  $0.012 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  (précision de pointée) correspondent à des trajectoires immobiles. (J) Fraction des molécules diffusives dans l'ensemble des cellules (rouge), à l'intérieur (vert clair) des PRC et à l'extérieur (gris foncé) des PRC, en moyenne  $\pm$  SEM. (K) Longueurs normalisées de l'ensemble des trajectoires suivies en sptPALM. \*\*\* $p < 0.001$  obtenu avec un test statistique, Kruskal-Wallis.*

Les expériences de sptPALM ont permis de mettre en évidence le comportement diffusif des molécules individuelles de la dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique et le recrutement aux PRC (Figure 65). Pour les expériences réalisées sur les cellules NIH-3T3, la dyn1-mEos3.2 a été surexprimée. La surexpression peut entraîner une modification de l'organisation et de la diffusion de la protéine d'intérêt. Afin de se placer dans un contexte plus proche du niveau d'expression endogène de la dyn1-mEos3.2, et d'éviter les biais liés à la surexpression, des cellules MEF où les 3 isoformes de la dynamine sont inactivés (MEF TKO Dynamine (Park et al., 2013; Rosendale et al., 2018)) ont été utilisées pour l'ensemble des expériences suivantes.

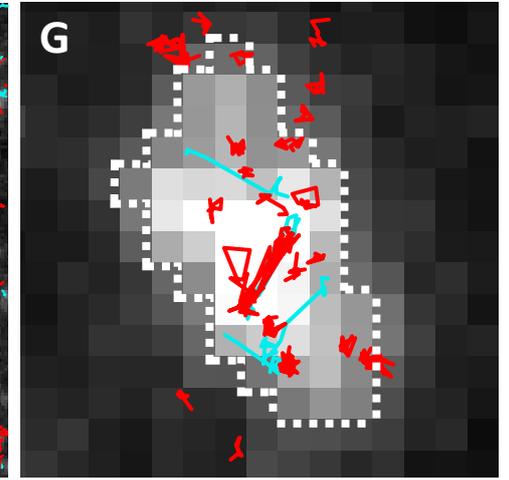
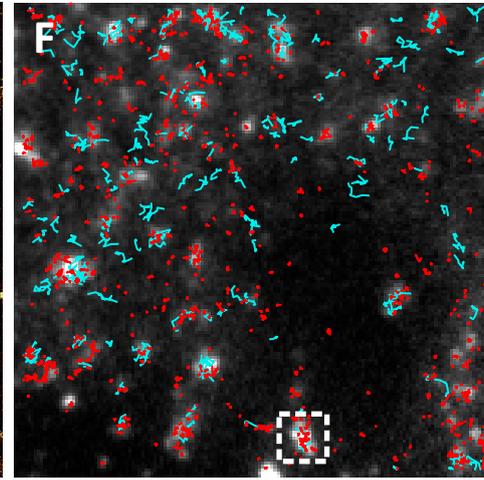
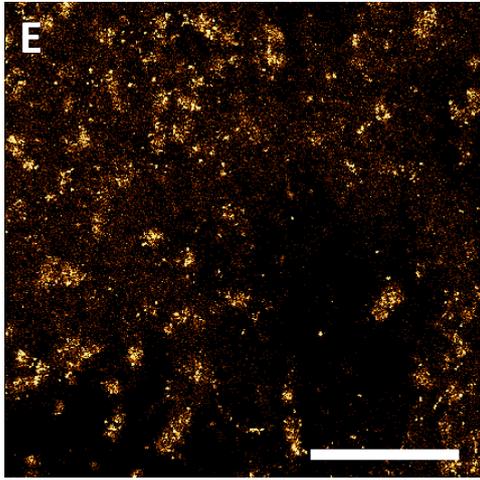
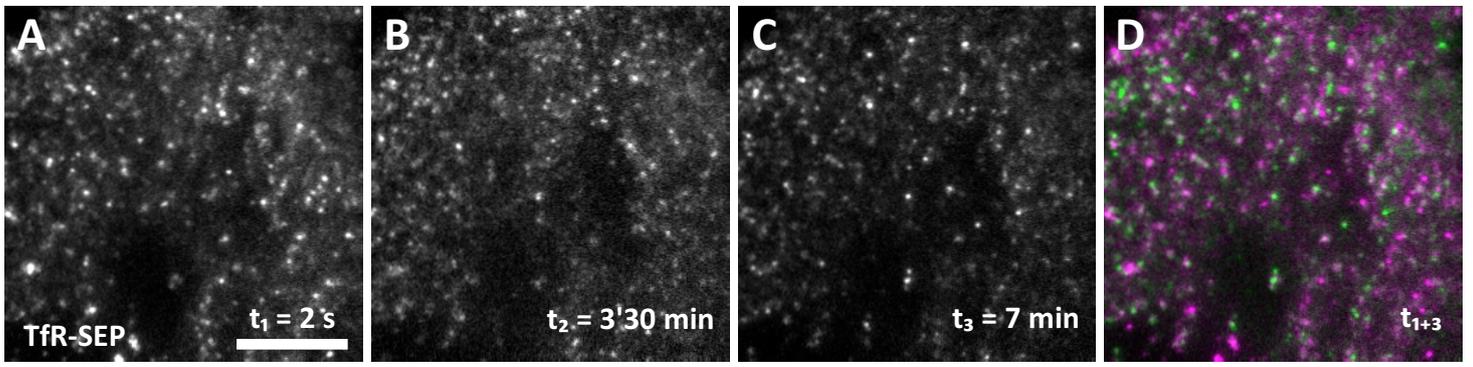
Comme dans la Figure 66, le TfR-SEP a été utilisé comme marqueur des PRC. Le TfR-SEP présente à nouveau un marquage léger et diffus à la membrane plasmique et plus intense aux PRC (Figure 67A-D). La labilité des PRC est toujours aussi évidente, même dans ces cellules MEF TKO re-exprimant la dyn1-mEos3.2 (Figure 67A-D). Les images d'intensité super résolues de sptPALM obtenues ont mis en évidence le recrutement de la dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique et montrent une distribution non uniforme de la dyn-1-mEos3.2 (Figure 67E), comme observé antérieurement dans les NIH-3T3 (Figure 66E). La reconnexion de la localisation des molécules individuelles de dyn1-mEos3.2 à partir des images séquentielles a permis de reconstituer les trajectoires des molécules individuelles de dyn1-mEos3.2 à la surface de la membrane plasmique (Figure 67F) et d'en représenter la distribution du coefficient de diffusion (Figure 67H). Le nombre de pas par trajectoire des molécules individuelles de dyn1-mEos3.2 est similaire à celui observé dans les NIH-3T3 (Figure 66K) variant entre 2 et 30 indiquant

que les molécules de dyn1-mEos3.2 peuvent être suivies jusqu'à 600 ms (Figure 67L). Ce résultat suggère que la stabilité de la dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique n'est pas affectée par le modèle cellulaire utilisé ou encore par sa surexpression.

Dans cette condition où la dynamine endogène a été supprimée, les données de sptPALM montrent toujours deux comportements diffusifs de la dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique, représentés par une courbe à deux pics, avec une diffusion lente (coefficient moyen de  $0.0056 \mu\text{m}^2/\text{s}^{-1}$  ( $\log(D) = -2.25$ )) et une diffusion rapide (avec un coefficient moyen de  $0.18 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  ( $\log(D) = -0.74$ )) (Figure 67H). Les comportements diffusifs de la dyn1-mEos3.2 à l'intérieur et à l'extérieur des PRC montrent une augmentation significative de la population de molécules à diffusion lente et immobile au sein des PRC (88,4 % de diffusion lente pour 11,6 % de diffusion rapide à l'intérieur des PRC versus 77,5 % de diffusion lente et 22,5 % de diffusion rapide à l'extérieur des PRC) (Figure 67 et Figure 66J).

La diffusion de la dyn1-mEos3.2 présente deux comportements distincts, avec une diffusion immobile et lente et une diffusion rapide, à la fois dans les cellules NIH-3T3 où la dyn1-mEos3.2 est surexprimée et dans les cellules MEF TKO Dynamine. Néanmoins la fraction de diffusion rapide en cellule entière, est plus importante pour la dyn1-mEos3.2 dans les cellules NIH-3T3 que dans les MEF TKO Dyn. Cette différence de fraction mobile entre les cellules NIH-3T3 (Figure 66J) et les MEF TKO Dynamine (Figure 67J) peut s'expliquer par la différence du type cellulaire mais aussi par l'effet de surexpression de la dyn1-mEos3.2 qui s'ajoute à l'expression de la dynamine endogène qui pourrait déjà occuper les sites d'interaction dans les PRC, diminuant ainsi les interactions de la dyn1-mEos3.2 avec ses partenaires et engendrant donc une augmentation de la fraction de diffusion rapide de la dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique. Pour comprendre le mécanisme moléculaire du processus de recrutement membranaire, une analyse approfondie de la mobilité des molécules de dyn1-mEos3.2 liées à la membrane plasmique a été réalisée avec l'analyse de la taille des pas. L'histogramme de la distribution de la taille des pas des molécules de dyn1-mEos3.2 indique que sa diffusion est significativement réduite aux PRC par rapport aux tailles de pas décrites par les molécules hors PRC (Figure 67K).

L'ensemble de ces données ainsi que celles récoltées avec les cellules NIH-3T3 démontrent que les molécules de dyn1-mEos3.2 sont recrutées et diffusent à la membrane plasmique et confirme aussi que ces molécules diffusent plus lentement à l'intérieur des PRC qu'à l'extérieur, suggérant une immobilisation des molécules de dyn1-mEos3.2 aux PRC.



■ Immobiles/Lentes ■ Rapides

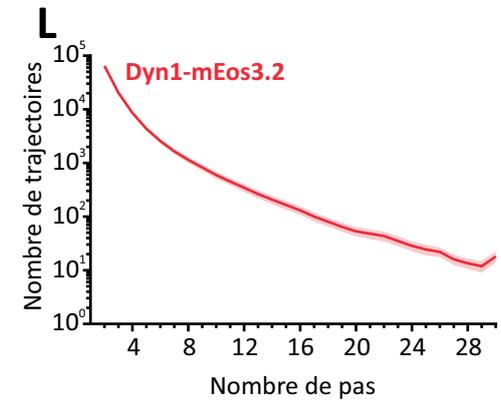
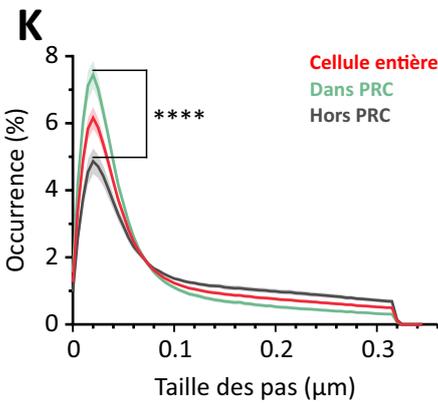
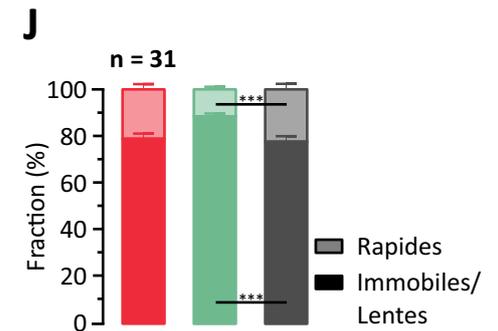
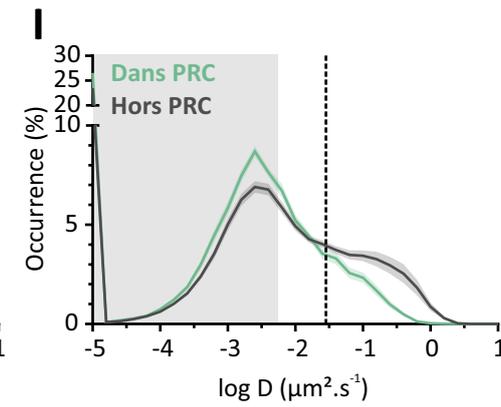
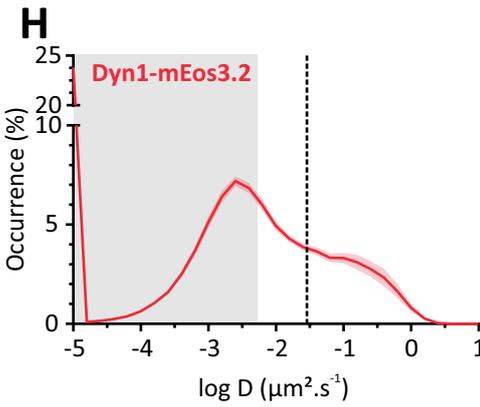


Figure 67 | La dynamin1-mEos3.2 diffuse plus lentement à l'intérieur des PRC de MEF TKO Dynamine.

**(A-D)** Image d'une cellule MEF TKO Dynamine exprimant le TfR-SEP qui marquent les PRC à l'instant  $t_1$  (A),  $t_2$  (B),  $t_3$  (C) et la superposition de  $t_1$  (magenta) et  $t_3$  (vert) (D). **(E)** Image d'intensité super-résolue de la dyn1-mEos3.2 (WT) obtenue par sptPALM à partir d'une séquence de 36 000 images de molécules uniques de mEos3.2 photoconverties dans le canal rouge (50 Hz, durée 12 min). **(F)** Image des trajectoires de plus de 8 images (160 ms) de molécules individuelles de dyn1-mEos3.2 photoconverties. Les trajectoires correspondantes sont codées en couleur pour indiquer leur vitesse de diffusion : diffusion  $\leq 0.028 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  ( $\log(D) = -1.55$ , diffusion lente/immobiles, rouge) et  $\geq 0.028 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  (diffusion rapide, cyan) (5484 trajectoires pour cette cellule). **(G)** Représentation d'un PRC et trajectoires avec un grossissement plus élevé de la zone délimitée en (F). Barres d'échelle en (A) et (E), 5  $\mu\text{m}$ . **(H, I)** Distribution moyenne des coefficients de diffusion ( $\log D$ ) de la dyn1-mEos3.2 à la surface des cellules (H), à l'intérieur (vert clair) et à l'extérieur (gris foncé) des PRC (I) ( $n = 31$  cellules pour 4 expériences indépendantes) (moyenne  $\pm$  SEM). Les zones grises incluant les valeurs de diffusion inférieures à la précision de pointée correspondent à des trajectoires immobiles. La ligne en pointillée noire ( $0.028 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  ( $\log(D) = -1.55$ )) représente la séparation biologique entre les deux populations distinctes de molécules. **(J)** Fraction des molécules diffusives dans l'ensemble des cellules (rouge), à l'intérieur (vert clair) des PRC et à l'extérieur (gris foncé) des PRC, en moyenne  $\pm$  SEM. **(K)** Histogramme de la distribution de la taille des pas des molécules de dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique sans information de localisation (rouge), à l'intérieur des PRC (vert clair) et à l'extérieur des PRC (gris foncé) ( $n = 3051830$  pas, de 31 cellules pour 4 expériences indépendantes). **(L)** Longueurs normalisée de l'ensemble des trajectoires suivies en sptPALM. \*\*\* $p < 0.001$  ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  obtenu avec un test statistique, Kruskal-Wallis.

## 2.2. La diffusion de la dynamine n'est pas impactée quel que soit l'étape de formation d'un PRC

Afin de déterminer plus précisément un changement de comportement diffusif des molécules de dyn1-mEos3.2 selon l'étape de formation des vésicules d'endocytose, les expériences de sptPALM sur les MEF TKO Dynamine ont été combinées au protocole de ppH (« Description du poste et de l'acquisition » p127). Le protocole de ppH permet de détecter le moment de scission des vésicules d'endocytose nouvellement formées avec une résolution temporelle de 2 secondes. Ainsi nous avons pu analyser plus précisément le comportement diffusif des molécules de dyn1-mEos3.2 analysées précédemment et ce tout le long de la formation des vésicules (aux PRC) et au moment de la scission.

La détection et l'analyse des évènements d'endocytose par le protocole ppH révèle que la fréquence des vésicules contenant le TfR-SEP est constante tout au long de l'expérience (Figure 68A). Ce résultat permet également de valider la fonctionnalité de la dynamine1 fusionnée génétiquement à la mEos3.2.

Une augmentation du nombre de trajectoires de molécules de dyn1-mEos3.2 est observée au moment de la scission des vésicules d'endocytose (Figure 68B), ce qui indique un recrutement plus important de la dyn1-mEos3.2 aux PRC au moment de la scission. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus précédemment (Figure 63B, phase 2) renforçant ainsi l'idée d'un recrutement plus important de la dynamine aux PRC pour effectuer la scission.

L'analyse des pas des molécules de dyn1-mEos3.2, 10 secondes avant et après la scission des vésicules, montre que la taille des pas est similaire à l'intérieur des PRC au moment de la scission (zone bleue) ou à n'importe quelle autre étape de la formation d'un PRC (courbe verte et bleue sont superposées sur le panel C Figure 68). En revanche, en dehors des PRC, la taille des pas décrits par les molécules de dyn1-mEos3.2 est significativement plus grande. Ces résultats permettent de conclure que 1) dans les PRC la dyn1-mEos3.2 diffuse plus lentement indépendamment de l'étape de formation des vésicules, et 2) en dehors des PRC la dyn1-mEos3.2 diffuse plus rapidement (voir Figure 67I, J).

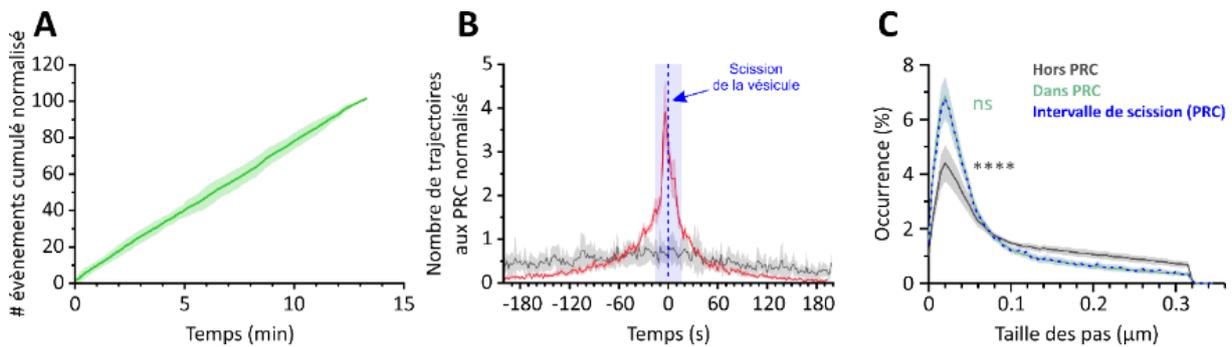


Figure 68 | La diffusion de la dynamine est la même aux PRC quel que soit le stade de formation de la vésicule.

**(A)** Nombre d'évènements d'endocytose cumulé normalisé en condition contrôle dans 10 cellules MEF TKO Dynamine co-exprimant le Tfr-SEP et la dyn1-mEos3.2 normalisée à la fin (12 min). **(B)** Nombre de pas détectés au moment de la scission des vésicules d'endocytose (ligne pointillée bleue) normalisés sur 10 cellules (moyenne  $\pm$  SEM). **(C)** Histogramme de la distribution de la taille des pas des molécules de dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique hors des PRC (gris), dans les PRC (vert) et dans l'intervalle de temps (zone bleu clair, comprise entre -10 et 10 secondes, panel C) de la scission des vésicules (ligne pointillée bleue, panel C) (bleu). \*\*\*\* $p$  <0.0001 obtenu avec un test statistique Kolmogorov-Smirnov.

### 3. Rôle des différents domaines de la dynamine

#### 3.1. La délétion de différents domaines de la dynamine entraîne un changement du comportement diffusif

Après avoir observé et caractérisé le recrutement et la diffusion de la dyn1-mEos3.2 à la membrane plasmique et aux PRC dans les cellules MEF TKO dynamine, je me suis intéressée aux rôles des différents domaines de la dynamine pour son recrutement et sa diffusion à la membrane plasmique et aux PRC. Des expériences de sptPALM ont été menées sur des MEF TKO Dynamine dans lesquelles nous avons exprimé des mutants de la dynamine ne contenant plus le domaine PH : dyn1- $\Delta$ PH-mEos3.2 (soit Dyn1- $\Delta$ PH, Figure 69B-D) ; le domaine PRD : dyn1- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (soit Dyn1- $\Delta$ PRD, Figure 69F-H) ou encore les domaines PH et PRD : dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (soit Dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD, Figure 69J-L).

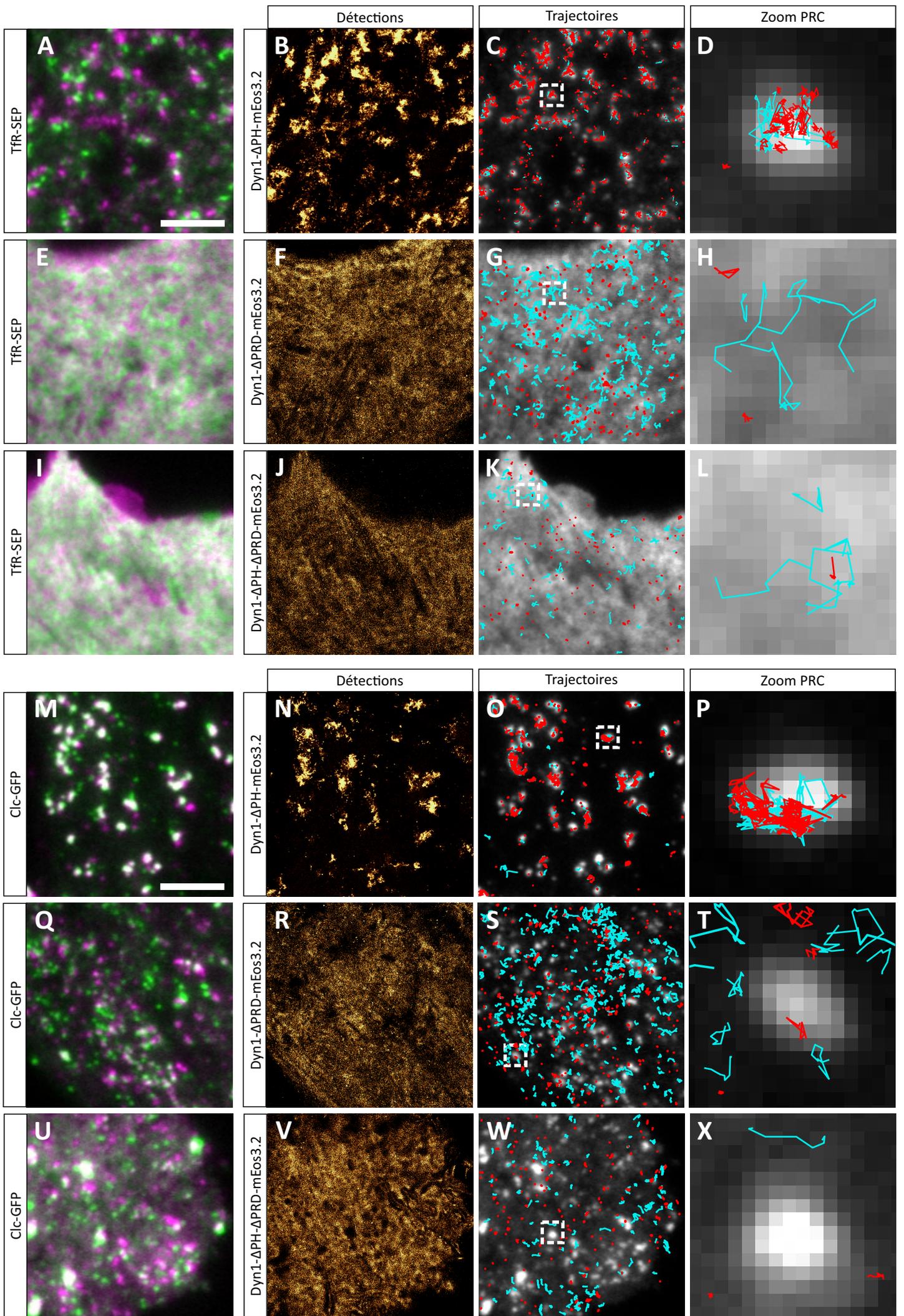


Figure 69 | La délétion de différents domaines de la dynamine entraîne un changement du comportement diffusif.

**(A, E et I)** Images de cellules MEF TKO Dynamine exprimant le TfR-SEP au début (magenta) et à la fin de l'enregistrement (vert). **(B, F et J)** Images d'intensité super-résolue de la dyn1- $\Delta$ PH-mEos3.2 (B), de la dyn1- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (F) et de la dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD-mEos3.2, obtenues par sptPALM à partir d'une séquence de 36 000 images de molécules uniques de la mEos3.2 photoconverties dans le canal rouge (50 Hz, durée 12 min). **(C, G et K)** Images des trajectoires de plus de 8 images (160 ms) de molécules individuelles de la dyn1- $\Delta$ PH-mEos3.2 (C), de la dyn1- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (G) et de la dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (K) photoconverties. Les trajectoires correspondantes sont codées en couleur pour indiquer leur vitesse de diffusion : diffusion  $\leq 0.028 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  ( $\log(D) = -1.55$ , diffusion lente/immobiles, rouge) et  $\geq 0.028 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  (diffusion rapide, cyan). **(D, H et L)** Représentations avec un grossissement plus élevé de la zone délimitée en (C, G et K respectivement). **(M, Q et U)** Images de cellules MEF TKO Dynamine exprimant la Clc-GFP au début (magenta) et à la fin de l'enregistrement (vert). **(N, R et V)** Images d'intensité super-résolue de la dyn1- $\Delta$ PH-mEos3.2 (N), de la dyn1- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (R) et de la dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (V), obtenues par sptPALM à partir d'une séquence de 36 000 images de molécules uniques éparses photoconverties de la mEos3.2 dans le canal rouge (50 Hz, durée 12 min). **(O, S et W)** Images des trajectoires de plus de 8 images (20 ms par image) de molécules individuelles de la dyn1- $\Delta$ PH-mEos3.2 (O), de la dyn1- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (S) et de la dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD-mEos3.2 (W) photoconverties. Les trajectoires correspondantes sont codées en couleur pour indiquer leur vitesse de diffusion (diffusion lente/immobiles en rouge ; diffusion rapide en cyan). **(P, T et X)** Représentations avec un grossissement plus élevé de la zone délimitée en présentant un PRC (C, G et K respectivement). Barres d'échelle, 5  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.1. Le domaine PH de la dynamine est important pour la scission vésiculaire

Les résultats montrent qu'en présence de dyn1- $\Delta$ PH, le TfR-SEP forme des agrégats à la membrane plasmique (Figure 69A) qui semblent être de taille plus importante qu'en condition contrôle (Figure 67A-D). La mesure et l'analyse des événements d'endocytose a été effectuée par la technique du ppH avec cette forme mutée de la dynamine1 et aucun événement d'endocytose n'a été détecté (résultats non illustrés). En effet, il a été démontré dans des études précédentes que la délétion du domaine PH, même en condition de surexpression, entraîne une inhibition de l'EDC (Bethoney et al., 2009; Lee et al., 1999; Ramachandran et al., 2009; Vallis et al., 1999).

L'image d'intensité super résolue de sptPALM obtenue à partir des cellules exprimant la dyn1- $\Delta$ PH montre une distribution non uniforme de la dyn1- $\Delta$ PH dans différentes régions subcellulaires regroupant les TfR-SEP non endocytés (Figure 69B). Ces résultats suggèrent donc que le domaine PH n'est pas nécessaire pour le recrutement de la dynamine aux PRC. La reconnexion de la localisation des molécules individuelles de dyn1- $\Delta$ PH à partir des images séquentielles a permis de reconstituer les trajectoires des molécules individuelles de dyn1- $\Delta$ PH à la surface de la membrane plasmique (Figure 69C, D). Ces trajectoires sont concentrées aux PRC et leur diffusion est lente voire immobile pour la majorité des molécules individuelles de dyn1- $\Delta$ PH (Figure 70A, B). Le mutant dyn1- $\Delta$ PH ne présente pas de différence significative pour les fractions à diffusion lente/immobile et rapide à la membrane (en gris, 80 % de diffusion lente/immobile et 20 % de diffusion rapide) comparé à la dyn1-mEos3.2 (en

rouge, 79 % de diffusion lente/immobile et 21 % de diffusion rapide) (Figure 70A, B). En revanche, l'histogramme de la distribution de la taille des pas des molécules des dyn1- $\Delta$ PH indique que le déplacement des molécules de dyn1- $\Delta$ PH est plus petit par rapport à la dyn1-mEos3.2 contrôle (Figure 70C) indiquant une diffusion plus restreinte aux PRC. De plus, le nombre de pas par trajectoire des molécules individuelles de dyn1- $\Delta$ PH varie entre 2 et 30 avec une augmentation du nombre de trajectoires de plus de 20 pas détectées comparé à la dyn1-mEos3.2 (Figure 70D), ce qui suggère que dyn1- $\Delta$ PH séjourne plus longtemps sur la membrane que dyn1 non mutée. En revanche, la quantification du nombre de trajectoires totales détectées par  $\mu\text{m}^2$  de surface cellulaire ne montre aucune différence du nombre de trajectoires de la dyn1- $\Delta$ PH comparé à la dyn1-mEos3.2 (Figure 70E). L'absence du domaine PH n'impacte pas le nombre de molécules de dynamine recrutées à la membrane plasmique.

Ces résultats montrent que, d'une part le domaine PH est nécessaire pour la diffusion de la dynamine à la membrane plasmique, comme cela avait été proposé antérieurement par (Zheng et al., 1996) mais pas pour son recrutement aux PRC et d'autre part, qu'il est nécessaire pour la scission vésiculaire (Bethoney et al., 2009; Lee et al., 1999; Ramachandran et al., 2009; Vallis et al., 1999).

### 3.1.2. Le domaine PRD de la dynamine est important pour son recrutement et son immobilisation aux PRC

Les résultats montrent qu'en présence de la dyn1- $\Delta$ PRD ou de la dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD, le TfR-SEP présente un marquage membranaire diffus et homogène. Dans la littérature, la délétion du domaine PRD de la dynamine inhibe l'endocytose (Gad et al., 2000), suggérant que le TfR-SEP n'est plus internalisé mais accumulé à la membrane plasmique. Pour les mutants dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD, les images d'intensité super résolues de sptPALM montrent une distribution uniforme de ces mutants à la membrane plasmique (Figure 69F, J), indiquant ainsi que le domaine PRD est nécessaire au recrutement et à l'immobilisation de la dynamine aux PRC. La reconnexion de la localisation des molécules individuelles de dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD à partir des images séquentielles a permis de reconstituer les trajectoires des molécules individuelles pour la dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD à la surface de la membrane plasmique (Figure 69G, H, K, L). Ces trajectoires sont distribuées aléatoirement à la surface membranaire et leur diffusion est rapide pour la majorité des molécules individuelles de dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD (Figure 69G, H, K, L). Puisque les mutations de la dynamine1 affectent l'endocytose du TfR-SEP et donc son agrégation aux PRC, ces expériences ont été répétées en présence d'un autre marqueur des PRC, la Clc-GFP. Ainsi nous avons pu vérifier que même en présence des différents mutants, la Clc-GFP se concentre dans des PRC, comme c'est le cas dans les cellules MEF

TKO non transfectées (Ferguson et al., 2009) nous permettant ainsi d'évaluer plus précisément le profil de diffusion des différents mutants aux PRC (Figure 69M, Q, U). Les images d'intensité super résolues de sptPALM ainsi que la reconnexion de la localisation des molécules individuelles pour les différents mutants (même pour le mutant dyn1- $\Delta$ PH) montrent un profil similaire à ceux observés lors de leur co-expression avec le TfR-SEP (Figure 69N-P, R-T, V-X). De façon intéressante, le marquage de la Clc-GFP permet de mettre en évidence que les trajectoires décrites par les mutants dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD ne sont pas concentrées au niveau des PRC (Figure 69T, X). Ces résultats renforcent ainsi l'idée que le domaine PRD participe au recrutement de la dynamine aux PRC. L'analyse des données de sptPALM montrent des comportements diffusifs différents pour les mutants dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD comparés à la dyn1-mEos3.2 en condition contrôle. Pour les mutants dyn1- $\Delta$ PRD (en jaune, 61 % de diffusion lente/immobile et 39 % de diffusion rapide) et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD (en bleu, 51 % de diffusion lente/immobile et 49 % de diffusion rapide), leur diffusion membranaire est plus rapide qu'en condition contrôle avec une augmentation du pourcentage de la population mobile et un coefficient moyen de  $0.18 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $\log(D) = -0.74$ ) (Figure 70A, B). L'histogramme de la distribution de la taille des pas pour ces deux mutants montre des pas significativement plus grands comparé aux molécules de dyn1-mEos3.2 en condition contrôle (Figure 70C). Aucune différence entre les deux mutants dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD n'est observée au niveau de la diffusion ou de la taille des pas (Figure 70B, C). Le nombre de pas par trajectoire de molécules individuelles de dyn1 varie entre 2 et 30 pour l'ensemble des mutants avec une diminution du nombre de trajectoires de plus de 20 pas détectées pour les mutants dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD (Figure 70D), suggérant une durée réduite de liaison de ces mutants à la membrane. La quantification du nombre de trajectoires totales détectées par  $\mu\text{m}^2$  de surface cellulaire montre une diminution significative du nombre de trajectoires pour les mutants dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD comparé à la dyn1-mEos3.2 et dyn1- $\Delta$ PH (Figure 70E). Ces résultats renforcent l'idée que le domaine PRD est important pour que la dynamine soit recrutée de façon stable à la membrane et ainsi être détectée en sptPALM. De plus, il est intéressant de noter que le double mutant de dynamine, dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD, est toujours recruté à la membrane plasmique (de façon réduite), suggérant une interaction de la dynamine avec la membrane ou avec une autre protéine n'impliquant pas ses domaines PH et PRD.

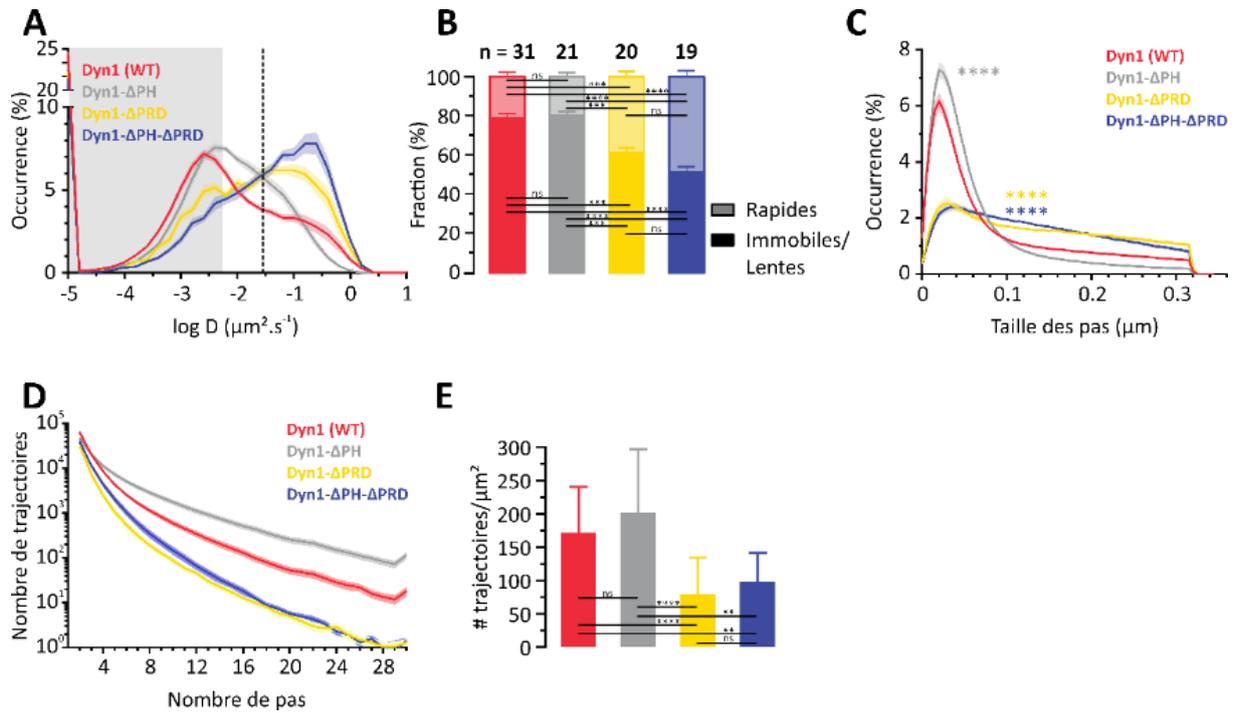


Figure 70 | La délétion des domaines PH et PRD impacte la diffusion de la dynamine.

**(A)** Distribution moyenne des coefficients de diffusion (log D) de la dyn1-mEos3.2 (rouge), de la dyn1-ΔPH-mEos3.2 (gris), de la dyn1-ΔPRD-mEos3.2 (jaune) et de la dyn1-ΔPH-ΔPRD-mEos3.2 (bleu) à la surface membranaire sans information de localisation (n renseigné sur le panel (B) pour 4 expériences indépendantes) (moyenne ± SEM). La zone grise incluant les valeurs de diffusion inférieures à  $0.0055 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (précision de pointée) correspondent à des trajectoires immobiles. **(B)** Fraction des molécules diffusives de la dyn-1-mEos3.2 (rouge), de la dyn1-ΔPH-mEos3.2 (gris), de la dyn1-ΔPRD-mEos3.2 (jaune) et de la dyn1-ΔPH-ΔPRD-mEos3.2 (bleu), en moyenne ± SEM. **(C)** Histogramme de la distribution de la taille des pas des molécules de dyn1-mEos3.2 et de ces mutants à la membrane plasmique sans information de localisation. Les mutants dyn1-ΔPH, dyn1-ΔPRD et dyn1-ΔPH-ΔPRD sont tous significativement différents de la dyn1-mEos3.2 **(D)** Longueurs normalisées de l'ensemble des trajectoires suivies en sptPALM pour la dyn1-mEos3.2 et des mutants de la dyn1. **(E)** Représentation du nombre de trajectoires totales détectées, tout au long de l'enregistrement (12 min), par  $\mu\text{m}^2$  de surface cellulaire.  $**p < 0.01$  ;  $***p < 0.001$  ;  $****p < 0.0001$  obtenu avec un test statistique ANOVA 1 voie (B), un test Kolmogorov-Smirnov (C) ou un test Kruskal-Wallis (E).



# Discussion et perspectives

Bien que 30 années de recherche sur la dynamine aient permis de comprendre de nombreux aspects sur la scission membranaire par la dynamine, le fonctionnement et l'organisation dynamique de cette protéine dans les cellules vivantes restent non élucidés. Dans cette étude, la combinaison de différentes techniques m'a permis d'analyser la diffusion de la dynamine ainsi que sa fonction de scission pendant la formation de vésicules d'endocytose dans des fibroblastes vivants. J'ai ainsi mis en évidence que la dynamine présente un recrutement biphasique aux PRC et que son activité GTPase impacte son recrutement et participe à la scission du cou des vésicules. J'ai également démontré que la dynamine est recrutée et diffuse à la membrane plasmique et qu'elle se retrouve confinée une fois présente aux PRC. L'utilisation de différents mutants de la dynamine combiné à la technique du sptPALM et à l'étude fonctionnelle de scission par le protocole de ppH ont permis de corréler pour la première fois le comportement moléculaire diffusif de la dynamine à sa fonction dans la scission des vésicules d'endocytose. J'ai ainsi pu mettre en évidence que le domaine PH de la dynamine est important pour la scission et que le domaine PRD est essentiel pour le recrutement et le confinement de la dynamine aux PRC et donc pour sa fonction de scission. Enfin j'ai montré pour la première fois que les molécules de dynamine recrutées aux PRC sont échangées en continu au sein de cette structure pendant toutes les étapes de la formation d'une vésicule.

## 1. Le protocole ppH comme test quantitatif de l'EDC dans les cellules

L'étude de l'endocytose en cellules repose sur la distinction entre le cargo internalisé et celui resté à la membrane plasmique. Les techniques classiques (« Mesure de l'internalisation de la transferrine » p136) ne permettent pas d'obtenir une vision dynamique de la formation des PRC individuels, car on ne dispose pour chaque cellule ou structure marquée que d'un intervalle de ce processus entre le moment du marquage et la fixation. Le développement de la technique du ppH (Perrais and Merrifield, 2005; Taylor et al., 2011) a été crucial pour révéler la dynamique temporelle du recrutement des protéines de l'endocytose tout au long de la formation des vésicules dans les cellules vivantes.

La comparaison entre le protocole de ppH et la technique classique d'internalisation de la Tfn a permis de démontrer la fiabilité de cette technique pour la détection et la visualisation spatio-temporelle des vésicules d'endocytose et la quantification par mesure du nombre d'évènements d'endocytose détectés suite à l'utilisation d'inhibiteur (Lampe et al., 2014b; Rosendale et al., 2017,

2018; Shen et al., 2014). Suite à l'ensemble de ces contrôles validant sa robustesse (« La genèse du protocole ppH » p103), le protocole de ppH a été couplé à d'autres techniques comme nous l'avons démontré dans cette étude, avec le couplage d'une fibre optique permettant le décaageage de molécules inhibitrices et du patch-clamp pour la dialyse intracellulaire de ces molécules inhibitrices (« La dialyse cellulaire et l'enregistrement patch-clamp » p109) ou encore son couplage à la technique de super résolution sptPALM (« Description du poste et de l'acquisition » p127). Le couplage de ces différentes techniques au protocole ppH est important car il permet d'étudier le rôle et le comportement moléculaire de la dynamine aux PRC en fonction des stades de formation vésiculaire dans les cellules vivantes.

## 2. Recrutement biphasique de la dynamine aux PRC

Le profil de recrutement de la dynamine a été finement corrélée à son activité de scission dans des cellules vivantes pour la première fois grâce au développement du protocole de ppH par David Perrais et Christien Merrifield (Merrifield et al., 2005; Taylor et al., 2011). Le protocole de ppH permet d'observer le recrutement des protéines de dynamine aux PRC et d'avoir accès à l'information de scission vésiculaire. Avec cette technique j'ai pu mettre en évidence que le recrutement de la dynamine est biphasique avec une phase de recrutement lente pendant la formation des vésicules d'endocytose et une phase plus rapide avant la scission vésiculaire.

L'utilisation du dyngo-4a (inhibiteur non-compétitif de l'activité GTPase) montre un ralentissement du recrutement des molécules de dynamine pour les 2 phases et une inhibition de l'EDC. La concentration maximale testée de cet inhibiteur mène à la disparition du profil biphasique de la dynamine et à son accumulation maximale aux PRC. Une étude réalisée dans le laboratoire de Merrifield a analysé le profil de recrutement de différents mutants du domaine GTPase de la dynamine à l'aide du protocole de ppH (Figure 36) (Taylor et al., 2012). De façon intéressante, le mutant T65A de la dynamine1 montre un profil de recrutement similaire à celui obtenu avec une concentration de 30  $\mu$ M de dyngo-4a. Ce mutant, T65A, présente une activité GTPase réduite et une inhibition de l'EDC. L'étude morphologique par microscopie électronique des stades de formation des PRC dans des cellules surexprimant ce mutant montre également une accumulation des PRC présentant un long cou. Dans cette même étude, un autre mutant (dynamine 1 K44A) où l'activité GTPase de la dynamine1 est absente (Ferguson et al., 2009) et bloque totalement l'EDC, présente une accumulation encore plus importante des PRC présentant un long cou. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'activité GTPase par le dyngo-4a effectué dans cette étude pourrait agir de façon similaire à ces formes mutées de la dynamine1. Pour confirmer cela, il serait intéressant de réaliser des expériences de microscopie électronique sur des cellules incubées avec ces deux concentrations

de dyngo-4a (30 et 100  $\mu\text{M}$ ) et analyser la morphologie des stades de formation des PRC bloqués par cet inhibiteur.

Le dyngo-4a est décrit dans la littérature comme un inhibiteur non compétitif de l'activité GTPase. Toutefois, le site de liaison du dyngo-4a et son mécanisme d'action demeurent obscurs à ce jour (Eschenburg and Reubold, 2018). Cependant, son activité inhibitrice réside dans sa capacité à inhiber fortement l'activité GTPase des molécules de dynamine assemblées en hélice (Mccluskey et al., 2013). Ainsi le ralentissement de la deuxième phase de recrutement de la dynamine, son accumulation aux PRC et l'inhibition consécutive de la scission vésiculaire sont des phénomènes attendus. Néanmoins, le ralentissement de la première phase de recrutement et l'accumulation de la dynamine aux PRC en présence de dyngo-4a étaient surprenants puisque ces données suggèrent un rôle de l'activité GTPase dans l'oligomérisation de la dynamine pour la maturation des PRC à des stades précoces. De plus, une étude récente utilisant une nouvelle technique de détection très sensible de l'hydrolyse du GTP via l'utilisation d'anticorps capables de fixer le GDP, produit de l'hydrolyse du GTP par le domaine GTPase, a montré que le dyngo-4a n'influait pas l'activité basale de la GTPase de la dynamine 1 non assemblée, alors que l'activité de la GTPase stimulée par l'assemblage sur des nanotubes lipidiques était inhibée (Mohanakrishnan et al., 2017). Ainsi, cette observation plaide fortement pour un rôle de l'activité GTPase dans l'oligomérisation de la dynamine et par conséquent pour la maturation des PRC. Il serait donc important de confirmer dans un premier temps que l'activité GTPase de la dynamine participe à l'oligomérisation de la dynamine. Ceci pourrait être réalisé par des études d'immunomarquage de la dynamine avec des particules d'or et de microscopie électronique dans des cellules fixées en présence de l'inhibiteur à 30  $\mu\text{M}$ . Puis, afin de vérifier le rôle de l'activité GTPase de la dynamine dans la maturation des PRC il serait important d'analyser la durée de vie totale des PRC en présence de dyngo-4a. L'analyse du temps de séjour des agrégats de TfR-SEP pourrait permettre de montrer l'impact direct de l'inhibition de l'activité GTPase sur l'oligomérisation des molécules de dynamine à des stades précoces, empêchant la formation et donc la maturation des vésicules d'endocytose. Ces expériences pourraient être complétées par l'étude de la morphologie par microscopie électronique des stades de formation des PRC bloqués en présence de cet inhibiteur.

Comme décrit ci-dessus, l'inhibition par le dyngo-4a cause un ralentissement des deux phases de recrutement de la dynamine et son accumulation aux PRC, détectée par le protocole ppH. Ce résultat suggère donc que les molécules de dynamine s'accumulent aux PRC en présence de dyngo-4a. Or, les résultats obtenus avec le FRAP indiquent que la vitesse d'échange ( $\sim 2$  s) en présence de cet inhibiteur reste inchangée. Il est cependant important de rappeler que le FRAP est une technique globale qui ne permet pas d'évaluer la diffusion de protéines à l'échelle de la molécule unique et donc empêche de comprendre comment celles-ci sont impactées dans leur comportement diffusif

par l'activité GTPase. Il serait donc important de réaliser des expériences de sptPALM en présence de dyngo-4a afin d'étudier l'impact de l'inhibition de l'activité GTPase dans la diffusion des molécules de dynamine et/ou le nombre de molécules recrutées.

Comme discuté précédemment, l'effet du dyngo-4a sur le recrutement biphasique et l'EDC est très similaire à celui des mutants de dynamine utilisés dans (Taylor et al., 2012) (Figure 36). Il se pourrait donc que l'inhibition de l'activité GTPase par le dyngo-4a bloque le dernier stade avant la scission de la vésicule d'endocytose lorsque les PRC présentent de longs cous comme démontré par les études de microscopie électronique de cette même étude. Il a été démontré que l'élongation du cou des PRC est due à une oligomérisation de la dynamine en hélice (Takei et al., 1995). Il se pourrait donc que l'effet du dyngo-4a à forte concentration entraîne la stabilisation de l'hélice de dynamine au cou des PRC. L'inhibition de l'EDC au stade de la formation de l'hélice est cohérente avec les expériences de FRAP montrant une immobilisation de 15% des molécules de dynamine. Ces 15% sont les molécules de dynamine figées dans l'hélice qui ne peuvent plus effectuer la scission vésiculaire. Néanmoins, 15% ne représente qu'une petite fraction de molécules immobilisées aux PRC. Il a été démontré que l'expression de différents mutants de la dynamine peut entraîner un arrêt de la formation des PRC à différents stades de maturation (Taylor et al., 2012). Compte tenu de la similarité du profil de recrutement entre les mutants utilisés dans cette étude (T65A et K44A) et le dyngo-4a dans nos expériences, il se pourrait donc que le dyngo-4a entraîne aussi un arrêt de la formation des PRC à différents stades de maturation. Ainsi, le faible pourcentage de molécules immobiles pourrait provenir du fait que les PRC photoblanchis n'étaient pas tous composé d'un long cou entourés d'une hélice stable. De façon à confirmer si les molécules de dynamine qui composent l'hélice entourant le cou des PRC y sont immobilisées ; il serait important de réaliser des expériences de FRAP en utilisant un autre inhibiteur qui induit l'arrêt de la formation des PRC au stade de la formation d'hélice de dynamine au cou de ces structures, tel que le GTP $\gamma$ S.

Les expériences réalisées avec le DMNPE-GTP $\gamma$ S, un inhibiteur de l'activité GTPase de la dynamine, montrent également une augmentation du recrutement de la dynamine aux PRC suite au décaageage en GTP $\gamma$ S, ainsi qu'une inhibition de l'endocytose. Ces résultats montrent ainsi que l'inhibition directe (DMNPE-GTP $\gamma$ S) ou indirecte (dyngo-4a) de l'activité GTPase a toujours pour conséquence une inhibition de la scission vésiculaire et une augmentation de l'accumulation de la dynamine aux PRC. Cette accumulation de la dynamine pourrait venir d'un défaut de maturation des PRC, mais ceci est réfuté par une étude utilisant l'ajout de GTP $\gamma$ S dans des synaptosomes de rat montrant la formation de longs cous tubulaires entourés de dynamine (Takei et al., 1995). Le GTP $\gamma$ S est un inhibiteur compétiteur du GTP, ainsi l'accumulation de la dynamine suite au décaageage du GTP $\gamma$ S (ou même à la dialyse de GTP $\gamma$ S directement dans la cellule) pourrait s'expliquer par une incapacité de la dynamine à se désassembler suite à la non hydrolyse du GTP $\gamma$ S. Ceci impliquerait que les

molécules de dynamine incapables d'hydrolyser le GTP $\gamma$ S ne peuvent plus se désassembler et continuent de former l'hélice. Ainsi, l'utilisation de cet inhibiteur n'empêche pas la formation de l'hélice de dynamine et l'accumulation de la dynamine aux PRC est due à une accumulation de ces molécules assemblées dans l'hélice de dynamine déjà présente, qui sont incapables d'effectuer l'hydrolyse du GTP et restent ainsi indéfiniment piégées dans cette structure, inhibant la scission vésiculaire. Afin de déterminer si le GTP $\gamma$ S entraîne la stabilisation de l'hélice de dynamine et par conséquent l'immobilisation des molécules de dynamine (ou d'une certaine population, comme vérifié avec le dyngo-4a) dans cette structure dû à leur incapacité d'hydrolyse et de désassemblage, il serait important de réaliser des expériences de FRAP et de sptPALM sur cellules vivantes dialysées avec cet inhibiteur.

### 3. Le domaine PRD est important pour le recrutement de la dynamine aux PRC

Dans les cellules MEF TKO Dynamine réexprimant la dyn1- $\Delta$ PRD l'EDC est inhibée (Rosendale et al., 2018) et la dynamine n'est plus recrutée aux PRC qui sont toujours présents sur la membrane plasmique, comme le montre le marquage ponctiforme de Clc-GFP.

Les résultats de sptPALM montrent que la délétion du domaine PRD n'empêche pas la diffusion de la dynamine à la membrane plasmique même si le nombre de molécules uniques détectées est significativement réduit comparé à la dynamine contrôle. De plus, la longueur des trajectoires de dyn1- $\Delta$ PRD détectées est raccourcie par rapport à la dyn1-mEos3.2 (Figure 70D) suggérant une disparition des molécules visibles à la membrane due à un ancrage plus faible et non pas à un photoblanchiment. Ces résultats mettent en évidence que le domaine PRD n'est pas indispensable pour la diffusion de la dynamine à la membrane plasmique mais qu'il est nécessaire au recrutement de la dynamine aux PRC. Ce mutant montre également une diffusion plus rapide, aléatoire et indépendante des PRC. Ceci pourrait être dû à une inhibition de l'interaction entre la dynamine et ses protéines cibles, causant une diffusion similaire à celle d'une protéine diffusant librement à la membrane (Rossier et al., 2012). D'autres expériences réalisées sur cellules ont mis en évidence que la délétion du domaine PRD n'entraînait plus la colocalisation de la dynamine avec les PRC (Ferguson et al., 2009). Ainsi, l'ensemble de mes résultats et de ces études suggère que l'inhibition de l'EDC par la suppression du domaine PRD de la dynamine est un effet indirect dérivant de l'incapacité de la dyn1- $\Delta$ PRD à être recrutée et ancrée aux PRC. Le domaine PRD de la dynamine interagit avec les domaines SH3 des protéines BAR telles que l'amphiphysine dans les neurones (Shupliakov et al., 1997b) et dans les lignées cellulaires (Meinecke et al., 2013), ainsi que probablement l'endophiline (Ferguson et al., 2009) et permettrait ainsi la coordination du recrutement de l'ensemble de ces

protéines au cou des PRC. De plus l'étude du recrutement de ces deux protéines BAR montre un profil de recrutement concomitant à celui de la dynamine (Taylor et al., 2011). Comme décrit dans l'introduction, les domaines BAR de ces protéines sont capables de sentir la courbure membranaire mais elles sont auto-inhibées par le repliement du domaine SH3 sur leur domaine BAR (Rao et al., 2010). L'interaction des domaines PRD-SH3 de la dynamine et des protéines BAR respectivement permettrait ainsi de lever cette auto-inhibition et ces protéines pourraient donc agir en synergie pour leur recrutement aux PRC pour ensuite effectuer la scission dépendante du GTP par la dynamine. En conclusion, cette interaction avec des protéines BAR serait cruciale pour le rôle fonctionnel de la dynamine puisque ces protéines permettraient la formation d'un hot spot aux PRC naissants, qui entraînerait une augmentation du recrutement de la dynamine et faciliterait ainsi son oligomérisation au sein des PRC. Dans ce contexte, la perte d'interaction avec les protéines BAR pourrait donc causer une inhibition de la scission du cou vésiculaire. Cependant, une question clé reste ouverte : ces protéines participent-elles aussi directement à la réaction de fission, que ce soit par un effet sur la courbure de la bicouche ou par leurs interactions avec la dynamine ? Les données à ce sujet sont contradictoires, et montrent à la fois des effets inhibiteurs et facilitateurs des protéines à domaine BAR sur l'activité GTPase et sur la fission par la dynamine (Farsad et al., 2001; Hohendahl et al., 2017; Meinecke et al., 2013; Neumann and Schmid, 2013; Peter et al., 2004; Yoshida et al., 2004). Les effets positifs peuvent s'expliquer par la propriété de ces protéines à faciliter l'assemblage des dynamines en raison de leur nature dimère (Peter et al., 2004) et de leur capacité à polymériser. L'effet négatif s'explique probablement par deux mécanismes : tout d'abord, la forme en croissant du domaine BAR peut bloquer tout autre rétrécissement par la dynamine en formant un échafaudage rigide de courbure fixe sur la membrane (Boucrot et al., 2012) ; deuxièmement, les échelons du domaine BAR pourraient s'intercaler entre des modules GTPase opposés dans la spirale de la dynamine qui expliquent l'augmentation signalée du pas de la dynamine en présence des protéines BAR (Farsad et al., 2001; Itoh et al., 2005; Sundborger et al., 2011; Takei et al., 1999). Cette insertion explique la réduction de l'activité de la GTPase car elle perturbe l'interaction du domaine G-G nécessaire à l'hydrolyse du GTP. A un rapport BAR/dynamine élevé, toutes les protéines du domaine BAR testées ont une action bloquante sur la fission à médiation dynamique (Hohendahl et al., 2017).

Ces études restent néanmoins limitées puisqu'elles se basent sur des expériences *in vitro* impliquant des protéines purifiées et des liposomes et il se pourrait que les effets antagonistes vérifiés dans ces études dérivent des différents modèles utilisés. Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction des protéines BAR avec la dynamine en réalisant des expériences de mutation du domaine SH3 de ces protéines et d'observer le profil de recrutement de ces protéines avec le protocole ppH.

## 4. Le domaine PH est important pour la scission vésiculaire

Un domaine atypique de la dynamine dans sa fonction est le domaine PH. Le domaine PH de la dynamine lie les PIP avec une très faible affinité ( $K_d > 1 \text{ mM}$ ) comparé à d'autres protéines contenant un domaine PH comme la PLC $\delta$ 1 (1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-1) ( $K_d = 6.1 \text{ nM}$ ) (Shimohama et al., 1998). Néanmoins cette interaction semble cruciale pour le fonctionnement de la dynamine dans l'EDC.

Les expériences de sptPALM couplées au protocole de ppH ont mis en évidence que la délétion du domaine PH n'empêche pas le recrutement ni la diffusion de la dynamine à la membrane plasmique mais qu'elle inhibe l'EDC. La dyn1- $\Delta$ PH est toujours capable d'être recrutée à la membrane même si la délétion de ce domaine entraîne un ralentissement de la diffusion observée par la réduction de la taille des pas des molécules de dynamine à la membrane et une localisation plus forte et plus stable aux PRC. Le nombre de molécules uniques détectées n'est pas diminué par la délétion de ce domaine, comparé à la dynamine contrôle. Ces résultats suggèrent donc que le domaine PH n'est pas nécessaire à la localisation des molécules de dynamine aux PRC mais qu'elle l'est en revanche pour la scission puisqu'aucune vésicule d'endocytose n'est formée. Ceci est en accord des études réalisées *in vivo* où l'expression de mutants du domaine PH de la dynamine n'altère pas la localisation subcellulaire de la dynamine aux PRC dans les cellules HeLa, malgré l'abolition de sa fonction de scission (Bethoney et al., 2009). D'autres études utilisant des approches *in vitro* et *in vivo* ont suggéré un rôle de ciseau moléculaire pour le domaine PH. L'hélice de dynamine se resserre autour du cou vésiculaire par hydrolyse du GTP et insère le domaine PH à l'intérieur de la bicouche lipidique pour la génération d'une forte courbure de la membrane et sa scission ultérieure (Chappie et al., 2011b; Danino et al., 2004; Kong et al., 2018; Mears et al., 2007; Ramachandran and Schmid, 2008; Ramachandran et al., 2009). De plus, la rotation des molécules de dynamine assemblées en hélice autour de tubules lipidiques maintenus à chaque extrémité (Roux et al., 2006a) pourraient suggérer que cette action de rotation permettrait au domaine PH inséré dans la membrane d'augmenter son action de ciseau moléculaire, en agissant comme un couteau qui pénètre dans le cou, sous la constriction et rotation des molécules de dynamine suite à l'hydrolyse du GTP (*un peu comme couper du pain, chaque main tient le pain et par une rotation on le coupe*).

Un autre rôle possible du domaine PH est d'augmenter la concentration en PI(4,5)P<sub>2</sub> au niveau du cou vésiculaire (Bethoney et al., 2009). En effet, malgré sa faible affinité pour le PI(4,5)P<sub>2</sub>, l'assemblage dynamique de la dynamine aux PRC entraîne une augmentation du nombre de domaines PH et donc d'avidité pour le PI(4,5)P<sub>2</sub>. Ainsi l'assemblage dynamique de la dynamine aux PRC pourrait tout de même entraîner une élévation de la concentration de PI(4,5)P<sub>2</sub> aux cous des PRC. La séquestration ou regroupement de PI(4,5)P<sub>2</sub> pourrait ainsi favoriser la scission des vésicules par des effets directs sur les

propriétés des membranes (Bethoney et al., 2009). Ces deux rôles supposés du domaine PH ne sont pas exclusifs et chacun de ces points pourraient expliquer l'observation de l'inhibition de scission pour ces dynamines privées de leur domaine PH. De façon à valider une des deux théories, il serait intéressant d'observer la localisation du PI(4,5)P<sub>2</sub> aux PRC dans des cellules exprimant le mutant dyn1-ΔPH et de vérifier si le PI(4,5)P<sub>2</sub> y est toujours concentré.

La double délétion des domaines PH et PRD montre des résultats intrigants, puisque ce mutant est toujours capable de diffuser à la membrane mais n'est plus recruté aux PRC, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec le simple mutant dépourvu du domaine PRD. De plus, la longueur des trajectoires détectées de dyn1-ΔPH-ΔPRD est similaire à celle du mutant dyn1-ΔPRD, c'est-à-dire raccourcie par rapport à la dyn1-mEos3.2, suggérant une disparition des molécules visibles à la membrane due à un ancrage plus faible et non pas à un photoblanchiment. D'autre part, ce double mutant n'est pas capable de reconstituer l'EDC dans les MEF TKO Dynamine et réduit significativement le nombre de molécules uniques recrutées à la membrane, comparé à la dynamine contrôle, et ce de la même façon que le simple mutant dépourvu du domaine PRD. Ainsi, l'arrêt de scission vésiculaire viendrait de la non-localisation de la dynamine aux PRC par l'absence du domaine PRD et par conséquent, le domaine PRD agirait avant le domaine PH pour la localisation correcte de la dynamine aux PRC. La diffusion membranaire de ce double mutant pourrait s'expliquer de deux façons, soit (1) par son interaction directe avec la membrane plasmique via un autre domaine (Figure 25), soit (2) par son interaction avec une autre protéine à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un autre domaine (domaine G, la « Tige » ou le « cou » Figure 25) que les domaines PH et PRD ou soit (3) par des interactions électrostatiques des 6 histidines (qui remplacent le domaine PH) avec des lipides membranaires ou une autre protéine. L'échange du domaine PH en 6 histidines vient d'une étude où les 6 histidines de ce mutant peuvent être recrutées sur des membranes contenant le chélateur lipidique DGS NTA(Ni<sup>2+</sup>) (NTA ; (Kubalek et al., 1994)) (Dar and Pucadyil, 2017). Afin d'élucider si les 6 histidines permettent un ancrage non spécifique de la dyn1-ΔPH-ΔPRD et de la dyn1-ΔPH, il faudrait produire des constructions plasmidiques en remplaçant les 6 histidines par une répétition de GGSGGS (G pour glycine et S pour sérine) formant un linker neutre. D'autre part, pour vérifier si l'interaction avec la membrane plasmique du double mutant dyn1-ΔPH-ΔPRD intervient grâce à un autre domaine, il faudrait créer une banque de mutants pour chacun des domaines et des combinaisons des domaines entre eux et vérifier leur recrutement et diffusion par sptPALM.

## 5. Dynamique d'échange et diffusion des molécules de dynamine aux PRC

Notre étude permet d'observer le recrutement de la dynamine et sa diffusion tout au long de la formation et de la maturation du PRC jusqu'à la scission vésiculaire (FRAP, sptPALM + ppH).

Le recrutement de la dynamine aux PRC à des stades précoces avant la scission pourrait laisser penser que ces molécules de dynamine sont recrutées et attendent de pouvoir former l'hélice qui permettra la scission. Or cette vision figée de la dynamine n'est pas compatible avec les expériences réalisées dans cette étude. Les données de FRAP mettent en évidence que les molécules de dynamine sont échangées en continu aux PRC en condition contrôle à des étapes précoces de la formation de l'invagination membranaire ou à des stades de maturation plus avancés dans l'invagination des PRC en U ou en  $\Omega$ . L'étude du profil de recrutement de la dynamine montre un recrutement biphasique, avec une première phase lente (maturation des PRC : -80 à -20 secondes) et une seconde phase plus rapide de recrutement (phase liée à la formation de l'hélice et à la scission vésiculaire : -20 à 0 secondes). L'utilisation du co-marquage de dyn1-mCh et dyn1-GFP permet de s'assurer que le PRC photoblanchi est toujours présent (120 secondes d'enregistrement après photoblanchiment) auquel cas, la dyn1-GFP non photoblanchie disparaîtrait également dû à la scission. En effet, après la scission membranaire la fluorescence de la dyn1-mCh chute à un niveau basal ne permettant plus de distinguer le PRC et empêche ainsi l'étude du retour de fluorescence à des stades correspondant à la deuxième phase de recrutement de la dynamine. Ainsi et compte tenu de cette fenêtre de temps avant la disparition du co-marquage par endocytose du PRC, nous savons que nous rendons compte de la dynamique d'échange de la dynamine à des stades précoces de formation et de maturation des PRC. Il serait possible d'imaginer que la fraction de molécules immobiles aux PRC ou même la vitesse d'échange soit affectée en fonction des stades plus tardifs de la formation du PRC. Pour tester cette hypothèse, des expériences de FRAP avec le GTPyS nous permettraient de bloquer l'étape de formation vésiculaire lorsque la dynamine est assemblée en hélice et de valider que la dynamine est échangée de la même façon quand elle est incorporée dans une hélice. Ceci permettrait de mettre en évidence que l'hélice de dynamine n'est pas une structure figée dans laquelle les molécules de dynamine sont piégées allant à l'encontre de la vision très statique des modèles de scission de la dynamine proposée dans la littérature (« Les différents modèles de scission » p85). En conclusion, ces expériences de FRAP permettent de mettre en évidence pour la première fois que la dynamine recrutée aux PRC n'est pas accumulée et piégée durant toute la formation d'un PRC, mais qu'elle est soumise à une dynamique d'échange tout au long de la formation et maturation d'un PRC.

Les expériences de FRAP nous ont permis d'obtenir une vision de la diffusion de la population des molécules de dynamine dans les PRC, mais ne permettent pas d'observer la diffusion des molécules

uniques de dynamine en fonction de l'étape de la formation vésiculaire. C'est pourquoi j'ai ensuite couplé la technique de sptPALM au protocole de ppH. Les expériences de sptPALM montrent que les molécules de dynamine, qui sont des protéines essentiellement cytosoliques, sont capables d'être recrutées et de diffuser à la membrane plasmique. La diffusion des molécules uniques de dynamine montre que leur diffusion est ralentie au PRC par rapport au reste de la cellule (peut-être par une interaction de leur domaine PRD avec des protéines BAR). Le couplage de la technique du sptPALM au protocole de ppH a permis une analyse plus fine de la diffusion des molécules de dynamine notamment au moment précédent la scission. Les résultats montrent que la diffusion des molécules de dynamine au PRC est la même quelle que soit l'étape de formation des vésicules. La non observation d'un ralentissement des molécules de dynamine avant la scission pourrait s'expliquer de deux façons : (1) soit les molécules de dynamine diffusent à des vitesses constantes quelle que soit l'étape de maturation du PRC, (2) soit le ralentissement des molécules de dyn1-mEos3.2 assemblées dans l'hélice juste avant la scission est trop bref par rapport à l'intervalle de temps d'observation de la diffusion de 20 secondes autour du moment de scission. Pour trancher, il serait intéressant d'analyser la diffusion et la taille des pas des molécules de dyn1-mEos3.2 dans un intervalle de temps plus réduit de 4 secondes avant la scission, lorsque le nombre de molécules recrutées est le plus important.

L'observation d'une diffusion constante de la dynamine, même au moment de la scission, semble être confirmée par l'analyse de la taille des pas en fonction de l'étape de la formation des vésicules qui reste inchangée, tandis que le nombre de molécules de dynamine avant la scission est augmenté. Ce profil est comparable au profil de recrutement observé avec le protocole ppH lors de l'analyse du recrutement global des molécules de dyn1-mCh pendant la seconde phase plus rapide. Ainsi, l'élément déterminant pour la fonction de scission de la dynamine serait l'augmentation rapide du nombre de molécules recrutées aux PRC à cette étape et non pas un ralentissement de la diffusion (voire piégeage) des molécules de dyn1-mEos3.2 au sein d'une hélice. L'analyse de la taille des pas dans les PRC 4 secondes avant la scission serait ainsi cruciale pour vérifier ceci.

Dans les cellules MEF TKO Dynamine ré-exprimant les mutants dyn1- $\Delta$ PRD et dyn1- $\Delta$ PH- $\Delta$ PRD, le TfR-SEP à la membrane montre un marquage diffus comparé à la condition contrôle, à l'inverse de la Clc-GFP qui est ponctiforme. En effet dans les cellules TKO dynamine l'EDC est abolie ce qui provoque l'accumulation de TfR sur la membrane plasmique. Ces récepteurs saturant les sites de liaisons des protéines adaptatrices AP-2 liées à la clathrine et ne sont donc plus concentrés dans les PRC. En revanche, les PRC sont toujours présents mais ils forment de longs couds dus aux protéines d'actine et d'endophiline marqués de clathrine à leur extrémité (Ferguson et al., 2009).

A l'inverse, dans les cellules MEF TKO Dynamine exprimant le mutant dyn1- $\Delta$ PH, l'EDC est bloquée mais la Clc-GFP ainsi que le TfR-SEP présentent un marquage ponctiforme. L'agrégation du TfR-SEP suggère que le TfR-SEP non endocyté reste piégé à l'intérieur des PRC par la dyn1- $\Delta$ PH accumulée aux

PRC (vérifiée avec le sptPALM) formant une hélice contractée qui agirait comme un garrot empêchant la diffusion du TfR-SEP à l'extérieur des PRC. Pour vérifier cette hypothèse il serait intéressant d'effectuer des expériences de FRAP dans ces cellules exprimant la dyn1- $\Delta$ PH-mCh et le TfR-SEP et d'analyser le retour de fluorescence aux PRC.

## 6. Modèle dynamique du recrutement et de diffusion de la dynamine pendant la formation des PRC

L'ensemble de mes résultats a permis de dresser un portrait dynamique du recrutement de la dynamine pendant toute la durée de vie des PRC et d'éclairer le rôle des différents domaines dans sa fonction pour la première fois dans des cellules vivantes (Figure 71).

La dynamine est recrutée et diffuse rapidement à la membrane (a). Grâce au domaine PRD la dynamine est recrutée aux PRC où sa diffusion est ralentie (a-e). Tout au long de la formation du PRC, les molécules de dynamine sont échangées et l'activité GTPase participe à la maturation du PRC (b-d). La diffusion de la dynamine est similaire pendant toutes les étapes de formation des PRC jusqu'à l'étape de scission vésiculaire, mais le nombre de molécules recrutées augmente pour les dernières étapes précédant la scission du cou des vésicules qui nécessite une forte activité GTPase (d, e). L'activité GTPase permettra la scission et la libération de la vésicule (e, f) qui sera ensuite déshabillée de son manteau de clathrine (f, g). Sans le domaine PH, la dynamine est présente aux PRC plus longtemps où elle diffuse plus lentement et ne permet pas la scission du cou des PRC (h, i). D'autre part, l'absence du domaine PH pourrait empêcher l'accumulation suffisante du PI(4,5)P<sub>2</sub> (h, i).

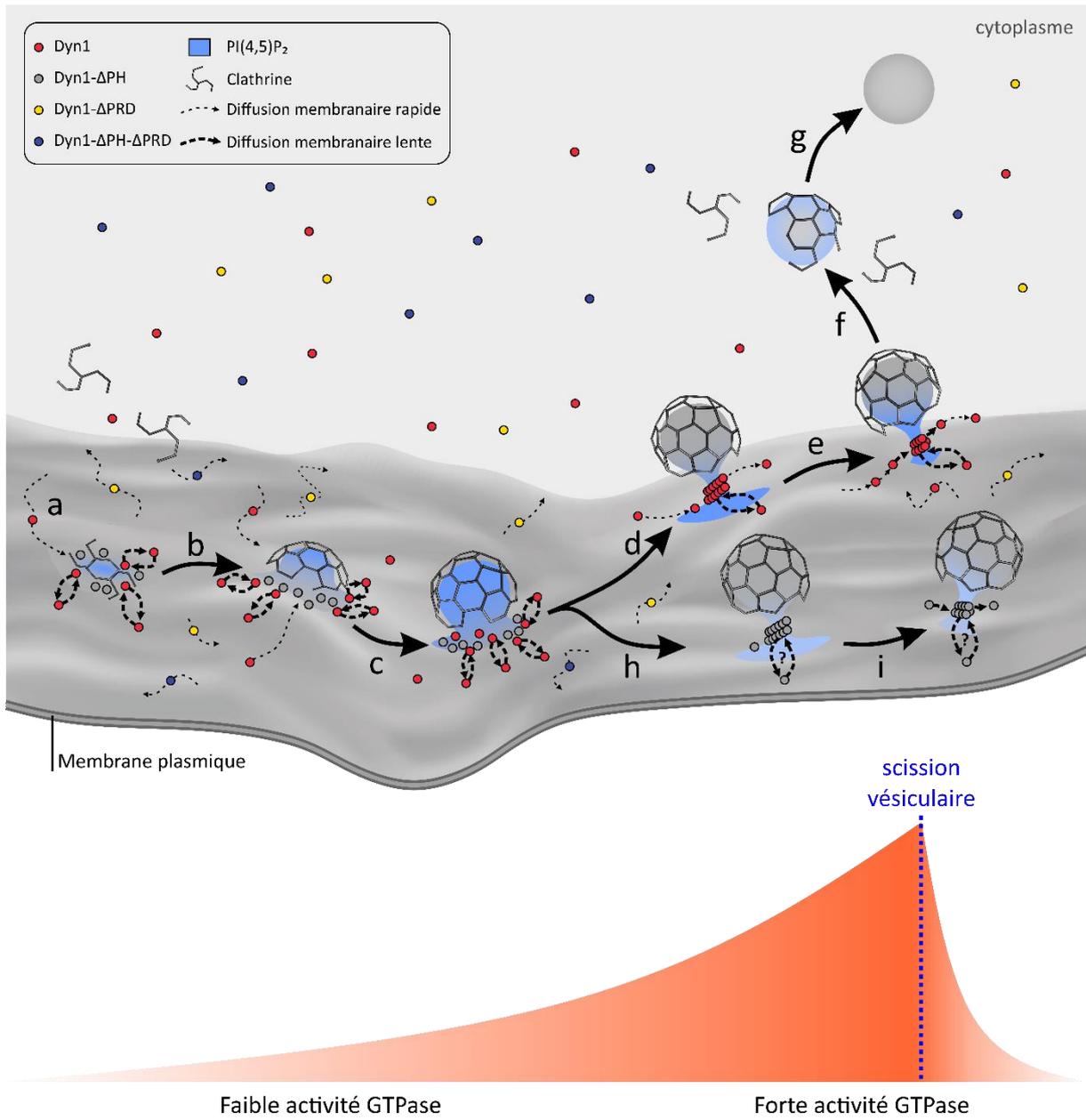


Figure 71 | Modèle dynamique du recrutement et de la diffusion de la dynamine pendant la formation des PRC.

## Annexes



# Functional recruitment of dynamin requires multimeric interactions for efficient endocytosis

**Authors:** Morgane ROSENDALE<sup>1,2,3,+</sup>, Thi Nhu Ngoc VAN<sup>1,2,4,+</sup>, Dolors GRILLO-BOSCH<sup>1,2,+</sup>, Silvia SPOSINI<sup>1,2</sup>, Léa CLAVERIE<sup>1,2</sup>, Isabel GAUTHEREAU<sup>1,2</sup>, Stéphane CLAVEROL<sup>5</sup>, Daniel CHOQUET<sup>1,2,6</sup>, Matthieu SAINLOS<sup>1,2</sup> & David PERRAIS<sup>1,2,\*</sup>

## **Affiliations:**

<sup>1</sup>University of Bordeaux and <sup>2</sup>CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France.

<sup>3</sup>Present address: Centre for Brain Science, RIKEN, Wako, Saitama 351-0198, Japan

<sup>4</sup>Present address: Sys2diag Montpellier, France

<sup>5</sup>Proteome Platform, Functional Genomic Center of Bordeaux, University of Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>6</sup>Bordeaux Imaging Center, UMS 3420 CNRS, Université de Bordeaux, US 4 INSERM, F-33000, Bordeaux, France

+ These authors contributed equally to this work, \*Lead author

**Correspondence:** Correspondence related to cell assays to D.P. ([david.perrais@u-bordeaux.fr](mailto:david.perrais@u-bordeaux.fr)). Correspondence related to peptide synthesis and assays to M.S. ([matthieu.sainlos@u-bordeaux.fr](mailto:matthieu.sainlos@u-bordeaux.fr)).

**Running title:** Multimeric interactions for dynamin recruitment

**Keywords:** SH3 domain, dynamin, amphiphysin, TIRF microscopy, multivalence

**Author contributions:** M.R., M.S. and D.P. conceived the study and formulated the models. M.R. performed most of the ppH patch clamp experiments and analysed the corresponding data. T.N.N.V. performed most TKO cell experiments and analysed the corresponding data. D.G-B. synthesized and characterized the peptides and performed the peptide pull-down experiments. I.G. produced and purified the SH3 domains. S.C. performed mass spectrometry data analysis. M.S. performed the SPR experiments and supervised all aspects of biochemical experiments. D.P. wrote the Matlab analysis programs, performed some ppH patch clamp and live cell imaging experiments and analysed the live cell imaging experiments. M.R. and D.P. wrote the manuscript and all the other authors edited the manuscript.

**Acknowledgements:** We thank Christelle Breillat, Célia Michel and Natacha Retailleau for help with plasmid constructs, Christopher Borcuk for help with Matlab programming, Pascal Desbarats (LaBRI, Talence) for counselling on the SVM for sorting scission events, Sébastien Marais (Bordeaux Imaging Center, part of the France BioImaging national infrastructure ANR-10-INBS-04) for help with the spinning disk confocal microscope. We thank Pietro De Camilli (Yale University) and David Drubin (UC Berkeley) for the gift of cell lines. We thank Volker Haucke (FMP, Berlin) for critically reading the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (Interface program), the Fondation Recherche Médicale (FRM), the Agence Nationale pour la Recherche (CaPeBIE ANR-12-BSV5-005) to D.P., the FRM, a pre-doctoral fellowship from the University of Bordeaux and a Labex BRAIN fellowship to M.R. and the European Research Council (advanced grant ADOS) to D.C.

## Abstract

During clathrin mediated endocytosis (CME), membrane scission is achieved by the concerted action of dynamin and its interacting partners. Essential interactions occur between the proline/arginine-rich domain of dynamin (dynPRD) and the Src-homology domain 3 (SH3) of various proteins including amphiphysins. Here we show that multiple SH3 domains must bind simultaneously to dynPRD through three adjacent motifs for dynamin's efficient recruitment and function. First, we show in dynamin triple knock-out cells that mutant dynamins modified in a single motif, including the central amphiphysin SH3 binding motif, are partially capable of rescuing CME. However, mutating two motifs largely prevents that ability. To support this observation, we designed divalent dynPRD-derived peptides. These ligands bind multimers of amphSH3 with >100-fold higher affinity than monovalent ones *in vitro*. Accordingly, dialyzing living cells with these divalent peptides through a patch-clamp pipette blocks CME 2 to 3 times more effectively than with monovalent ones. Finally, the frequency of endocytic events decreases with competing peptides or hypomorphic rescue mutants but the kinetics of dynamin recruitment is unaffected. This suggests that PRD-SH3 interactions act upstream of dynamin accumulation at the neck of nascent vesicles. We conclude from these data that dynamin drives vesicle scission *via* multivalent interactions *in vivo*.

## Introduction

Clathrin mediated endocytosis (CME) is fundamental to all eukaryotic cells. It is implicated in nutrient uptake, cell motility, cell signalling and neurotransmission (McMahon and Boucrot, 2011; Sigismund et al., 2012). The formation of clathrin coated vesicles (CCVs) from the plasma membrane involves more than 50 proteins, each recruited in specific steps. Multi-colour fluorescent live cell imaging of reference proteins, including clathrin, a constitutive cargo such as the transferrin receptor (TfR), as well as other associated proteins, has unveiled a stereotyped sequence of protein recruitments leading to CCV formation (Kaksonen and Roux, 2018; Taylor et al., 2011). This choreography is orchestrated by a dense network of protein-protein and protein-lipid interactions, which, taken individually, are rather weak. This initially surprising property has been proposed to ensure the directionality and irreversibility of the process (Schmid and McMahon, 2007). Therefore, understanding how this intricate network is organized and regulated in space and time is a major challenge of the field.

The large GTPase dynamin is essential for vesicle scission (Ferguson et al., 2009) and is primarily recruited at the last steps of vesicle formation (Aguet et al., 2013; Doyon et al., 2011; Taylor et al., 2011). Many aspects of the function of this indispensable protein have been deciphered (Antonny et al., 2016) but how its recruitment is regulated in cells is still a matter of debate. In this regard, the C-terminal proline/arginine rich domain of dynamin (dynPRD) is critical. It is a major interaction hub for SH3 domain-containing endocytic accessory proteins (Ferguson and De Camilli, 2012) that bears several class I (RxxPxxP) and class II (PxxPxR) SH3-binding motifs (where P is proline, R is positively charged arginine and x is any amino-acid)(Okamoto et al., 1997). These motifs interact with various specificities to many SH3 domain containing proteins involved in CME such as intersectin1-2 (Okamoto et al., 1999), endophilinA1-3 (Ringstad et al., 1997), amphiphysin1-2 (Grabs et al., 1997), syndapin1-3 (Qualmann et al., 1999), SNX9 and SNX18 (Lundmark and Carlsson, 2003). Among those, amphiphysins play a central role in regulating the recruitment of dynamin at CME sites (Meinecke et al., 2013; Owen et al., 1998; Shupliakov, 1997; Simpson et al., 1999; Takei et al., 1999). The amphiphysin specific binding site on dynPRD, conserved in all three dynamin isoforms, consists of two overlapping Class-II SH3-binding motifs resulting in its characteristic PxRPxR consensus sequence (Grabs et al., 1997). A so-called D15 peptide containing this particular motif has been extensively used to inhibit endocytosis in living cells (Jockusch et al.,

2005; Lüscher et al., 1999; Shupliakov, 1997; Yamashita et al., 2005). However, its low affinity for amphSH3, 90  $\mu$ M (Jockusch et al., 2005), makes it a poor competitor of endogenous dynamin. This suggests that the specific binding of a single SH3 to a given motif on dynPRD cannot solely account for the functional interaction of dynamin with its associated proteins *in vivo*.

The essential role of dynamin in CME, as well as the wealth of information about its recruitment to nascent endocytic vesicles and its interactions with SH3 domain containing proteins, makes the dynPRD-SH3 interaction network a very good candidate to test the hypothesis that weak individual interactions are reinforced by avidity effects in the scission machinery *in vivo*. To do so, we set up two complementary experimental approaches. First, we rescued CME in dynamin triple knock-out (TKO) cells (Park et al., 2013) by re-expressing a number of dynamin mutants. We show that multiple neighbouring SH3 binding motifs in the dynPRD are necessary for CME rescue and for the timely recruitment of dynamin to nascent CCVs. Second, we developed novel divalent peptide-based amphSH3 ligands that were designed to mimic the native interactions and bind multimeric amphSH3 domains with high affinity. To test these peptides in living cells, we set up a novel protocol that combines the ppH assay, which detects the formation of endocytic vesicles with high temporal resolution (Merrifield et al., 2005; Taylor et al., 2011), with patch-clamp mediated cell dialysis. We show that at a given concentration, these peptides block CME in living cells within minutes more efficiently than the commonly used monovalent D15. These results demonstrate the importance of multimeric interactions and avidity effects in regulating the scission machinery.

## Results

### Multiple SH3 binding sites are necessary for dynamin function in cells

We tested which feature of the PRD domain of dynamin is necessary for its optimal function in CME. We based our approach on rescuing CME in dynamin TKO cells by re-expressing wild-type or mutant dynamin2 (Figure 1A). Indeed, unlike the neuronally enriched dynamins 1 and 3, the ubiquitously expressed dynamin 2 was reported to fully rescue CME in dynamin1,2 KO cells. First, we confirmed the knock-out of endogenous dynamins and re-expression of dyn2-GFP to comparable levels by Western blot (Figure 1B, Supplementary

Figure 1A). We also validated the ability of dyn2-GFP to rescue CME by monitoring the uptake of Alexa568 labelled transferrin (A568-Tfn). Wild-type dyn2-GFP fully rescued the uptake of A568-Tfn ( $103.7 \pm 7.5$  % of control,  $p > 0.99$ ), normally abolished in TKO cells ( $22.8 \pm 1.6$  %,  $p < 0.0001$ , Figure 1C,E). We additionally verified that dyn2-GFP expression levels did not influence A568-Tfn internalisation (Supplementary Figure 1B) such that we could pool the data obtained with a given construct as a single dataset. Then, we tested dyn2-GFP mutated in the C-terminal portion of the PRD according to our hypothesis. We had noted that this domain contains three SH3 binding motifs that we labelled A, B and C. Motif B is part of the D15 peptide while motifs A and C flank motif B as illustrated in Figure 1D. As expected (Ferguson et al., 2009), neither re-expression of dyn2-GFP lacking the whole PRD domain (dyn2-GFP- $\Delta$ PRD) nor the D15-containing C-terminal domain (dyn2-GFP- $\Delta$ Cter) could rescue endocytosis in those cells (Figure 1E). But interestingly, the same phenotype was obtained with the much milder mutant dyn2-GFP-ABC<sub>mut</sub> in which only the 6 arginine residues present in motifs A, B and C were mutated to alanine (Figure 1E). On the other hand, mutating motif B alone (dyn2-GFP-B<sub>mut</sub>) resulted in a partial rescue of endocytosis (Figure 1E). This suggests that the flanking binding motifs A and/or C play a role in the rescue process, potentially by stabilizing the PRD-SH3 interaction. To test this hypothesis further we mutated these motifs individually. Mutating flanking motif A alone (dyn2-GFP-A<sub>mut</sub>) permitted a full rescue of CME. Mutating flanking motif C alone (dyn2-GFP-C<sub>mut</sub>) allowed a partial rescue, to a similar extent as when only the core motif B was mutated. These results thus reveal that motif B is not the sole determinant of dynamin function in CME. Consistent with these results on Tfn uptake, mutant dyn2-GFP localisation in cells was very diverse, from punctate for the active constructs (dyn2-GFP and dyn2-GFP-A<sub>mut</sub>) to homogenous for the inactive mutants (dyn2-GFP- $\Delta$ PRD/ $\Delta$ Cter/ABC<sub>mut</sub>) and intermediate for the partial mutants (Figure 1F). Hence our working model: binding of amphiphysin to the PRD requires the core B motif as well as another motif for stabilisation. Under normal conditions, this is achieved by binding to motif C. However, when this site is unavailable, motif B appears to be stabilised enough to impart a partial rescue. The prime candidate for this partial stabilisation is the flanking motif A, which when mutated alone appeared to play no role. We confirmed this hypothesis by mutating motifs A and C simultaneously (dyn2-GFP-AC<sub>mut</sub>). Under these conditions, the rescue of endocytosis was very poor (albeit significantly above the inactive mutants dyn2-GFP- $\Delta$ PRD,  $\Delta$ Cter and

ABC<sub>mut</sub>). Again, this confirms that the B (D15) motif alone is not sufficient to ensure the full functional recruitment of dynamin.

### Recruitment kinetics of dynamin PRD mutants

To understand at which stage of CME dynamin function was affected by PRD mutations, we analysed their recruitment using TIRF imaging in living cells. We compared the recruitment kinetics of dyn2-GFP mutants in TKO cells with that of genome-edited SKMEL cells expressing dyn2-GFP in the endogenous gene locus (Doyon et al., 2011). For this analysis, we chose four different dyn2-GFP constructs that showed various degrees of CME rescue: WT,  $\Delta$ Cter, B<sub>mut</sub> and AC<sub>mut</sub> (Figure 2A). In all cases, transient fluorescent clusters could be detected. However, as observed above in fixed cells, while mutated dyn2-GFP appeared to be homogeneously distributed, the wildtype construct displayed a punctuate distribution of dynamin clusters (Figure 2A). The average cell fluorescence outside clusters was thus significantly higher in these mutants (Figure 2B). Interestingly, the frequency of transient cluster detection correlated with the ability of the constructs to rescue CME: highest for dyn2-GFP-WT re-expression, intermediate for dyn2-GFP-B<sub>mut</sub>, low for dyn2-GFP-AC<sub>mut</sub> and essentially null for dyn2-GFP- $\Delta$ Cter where fluorescence was completely homogenous (Figure 2C). However, the peak amplitude (Figure 2D) and kinetics (Figure 2E) of these recruitment events were similar in all conditions, including in genome-edited cells. This suggests that the PRD-SH3 interaction regulates the probability of recruiting dynamin and that once it is initiated, it proceeds in a stereotyped manner to complete CCV formation.

Next, we directly assessed membrane scission achieved by the dyn2 mutants using the ppH assay. This assay relies on the overexpression of TfR fused to pH sensitive superecliptic pHluorin (TfR-SEP) as an endocytosis marker to detect the formation of single CCVs with a temporal resolution of 2 s (Merrifield et al., 2005; Shen et al., 2014; Taylor et al., 2011). We co-transfected TKO cells with TfR-SEP and dyn2-mCherry constructs. TfR-SEP was clustered at clathrin coated structures (CCSs) in cells co-transfected with dyn2-mCherry-WT or dyn2-mCherry-B<sub>mut</sub> (Figure 3A), but was homogeneously distributed on the plasma membrane in cells expressing dyn2-mCherry- $\Delta$ Cter or dyn2-mCherry-AC<sub>mut</sub> (Figure 3B). This is likely due to the redistribution of TfR to the plasma membrane and saturation of CCSs as already observed in

TKO cells (Ferguson et al., 2009). We detected nascent CCVs with the ppH assay in cells co-transfected with dyn2-mCherry and dyn2-mCherry-B<sub>mut</sub> at frequencies of  $0.025 \pm 0.009$  and  $0.004 \pm 0.002$  event.min<sup>-1</sup>. $\mu$ m<sup>-2</sup>, respectively. This significant difference ( $p = 0.016$ ) reflects the changes in Tfn uptake observed (Figure 1E). On the other hand, we observed some moving vesicles at pH 5.5 in cells co-transfected with dyn2-mCherry- $\Delta$ Cter or dyn2-mCherry-AC<sub>mut</sub> but the high intracellular background and lack of clustering on the plasma membrane precluded further characterization. We then moved on to compare endocytic events in cells transfected with the endocytically competent mutants. Both dyn2-mCherry-WT and dyn2-mCherry-B<sub>mut</sub> were readily recruited in a burst of fluorescence that peaked at the time of CCV formation (Figure 3C-F) as observed previously (Shen et al., 2014; Taylor et al., 2011). Remarkably, the peak fluorescence at the time of scission (-2 s) was smaller for cells expressing dyn2-mCherry-B<sub>mut</sub> than for cells expressing dyn2-mCherry-WT (Figure 3E,F). We hypothesised this could be due to a desynchronization of dynamin recruitment relative to scission. However, the recruitment kinetics of both dynamin mutants relative to CCV formation (Figure 3G), as well as the histograms of peak recruitment of individual events (Figure 3H), were similar before scission, arguing against this possibility. Therefore, we conclude that destabilisation of the dynPRD-SH3 interaction reduces the amount of dynamin at the time of scission.

### **Divalent D15-based ligands bind dimeric amphSH3 domains with high affinity**

To further test the model that multiple SH3 binding motifs in dynPRD are necessary for its recruitment to CCSs, we designed synthetic peptide-based ligands that preserved the key binding properties of dynamin in its capacity to interact simultaneously with multiple SH3 domains. We anticipated that such “biomimetic” ligands should inhibit CME with higher efficiency than the classical, monovalent, D15 peptide. First, we synthesized and compared the binding properties to SH3 domains of D15 and a peptide derived from the last 44 residues of dyn1-PRD (D44, Figure 4A) which encompasses motifs A and B defined in Figure 1D for dyn2-PRD. We produced the recombinant amphiphysin SH3 domain (amphSH3) in different forms: monomeric as a fusion to the small ubiquitin-like modifier (SUMO-amphSH3), or tetrameric by means of a complex between neutravidin and an enzymatically biotinylated SUMO-amphSH3 (Ntr-bSUMO-amphSH3). In addition, we produced the widely used GST fusion protein GST-amphSH3 (Grabs et al., 1997; Luo et al., 2016; Owen et al., 1998; Shupliakov,

1997; Solomaha et al., 2005) which makes dimers in solution (Fabrini et al., 2009) as shown by size exclusion chromatography (Figure 4B). Using surface plasmon resonance (SPR), we first measured the dissociation constants of the two peptides with SUMO-amphSH3. In both cases, the affinities were weak (37  $\mu$ M vs. 102  $\mu$ M respectively, Figure 4C,D) and the binding kinetics were too fast to be accurately measured. In contrast, robust binding of the dimeric GST-amphSH3 to D44 was observed, with an estimated  $K_D$  of 572 nM. Oppositely, there was no measureable binding to D15 below 1  $\mu$ M (Figure 4E). We attribute this dramatic gain in affinity to the fact that dimeric GST-amphSH3 can simultaneously bind motifs A and B, thereby stabilizing the interaction. To rule out any additional effect of the GST tag besides dimerization or the SUMO tag, we used the alternative multimeric amphSH3 obtained by reacting a biotinylated SUMO-amphSH3 with neutravidin. The resulting Ntr-bSUMO-amphSH3 complex also showed high affinity for D44 (17 nM) while no binding was observed for D15 in the concentration range that we used (Figure 4F). Of note, these increases in affinity for the dimeric and tetrameric amphSH3 assemblies were accompanied by slower dissociation rate constants, a hallmark of multivalent interactions.

Second, we designed synthetic ligands that mimic the presence of multiple SH3 binding motifs in dyn1-PRD. These divalent dynamin-derived peptide variants consist of two D15 peptide motifs linked through their N or C termini by PEG linkers (dD15-N and dD15-C: Figure 4A, Supplementary Figure 2 and Supplementary Table 1). They behaved in a qualitatively similar manner as D44 such that they bound GST-amphSH3 and Ntr-bSUMO-amphSH3 much more efficiently than monomeric SUMO-amphSH3. For example, dD15-N bound SUMO-SH3, GST-SH3 and Ntr-bSUMO-amphSH3 with  $K_{DS}$  of 65  $\mu$ M, 509 nM and 4.5 nM, respectively (Figure 4B-F). To further characterize the functional relevance of the increased valence of those peptides, we performed affinity isolation assays on brain lysates. In our conditions, D15 was unable to pull down any detectable amount of protein whereas dD15-N isolated a number of proteins, including a clear staining around 70-75 kDa, the awaited molecular weight for amphiphysin (Figure 4G). Moreover, mass spectroscopy analysis of the pull-down material showed that the co-precipitated proteins were highly enriched in CME related proteins and in particular in known interactors of dynamin such as intersectin1-2, amphiphysin1 and amphiphysin2 (also known as BIN1), endophilinA1-2 and SNX18 (Supplementary Table 2). Our *in vitro* data therefore support the idea that multimerisation of SH3 domains together with

the presence of multiple SH3 binding motifs in dynPRD play an essential role in increasing the affinity of their interaction by avidity effects.

### **Divalent peptides rapidly and completely inhibit CME in living cells**

We then assessed whether D44 (with motif A and B) and divalent D15-derived peptides exhibited an increased inhibitory activity over the monovalent D15 on CME. We monitored cellular endocytic activity using the ppH assay with new developments for fully automated analysis on a large number of cells (See Methods and Supplementary Figure 3). We combined this assay, which monitors in real time the endocytic activity of cells, with the patch-clamp technique in order to dialyse the relevant peptide at a known concentration inside the cellular cytoplasm to inhibit endocytosis acutely. Each recording consisted of 5 min in “cell-attached” mode (CA) with no dialysis followed by 10 min in “whole cell” mode (WC) during which the inhibitors were dialysed (Figure 5A,B). Each recording therefore had its own internal control condition, *i.e.* the cell-attached mode, from which we obtained the frequency ratio  $f = F_{WC}/F_{CA}$ , where  $F$  is the event frequency recorded during the indicated mode. Of note, the electrical parameters of patch clamp recordings were similar in all conditions (Supplementary Figure 4). We assessed the innocuousness and quantitative nature of this assay by monitoring the endocytic activity of unperturbed cells vs. cells dialysed with either a control solution (see methods for composition) or a solution in which GTP is replaced by its non-hydrolysable form, GTP $\gamma$ S, which prevents the GTP-hydrolysis dependent activity of dynamin (Jockusch et al., 2005; Yamashita et al., 2005). Patching the cells minimally affected their endocytic activity over a 10 min period (event frequency  $f = 67.3 \pm 4.3 \%$ ,  $n = 60$ , vs.  $90.7 \pm 14.9 \%$  in “no patching” recordings,  $n = 8$ ,  $p = 0.58$ ). Oppositely, dialysis of GTP $\gamma$ S rapidly abolished CCV formation (Figure 5C,D) ( $f = 11.2 \pm 4.1 \%$ ,  $n = 4$ ,  $p < 0.0001$ ). We then compared the inhibitory activities of dynPRD derived peptides. When used at 1 mM, D15, but not an inactive non-sense sequence, partially inhibited endocytosis within 10 min ( $f = 38.2 \pm 3.9 \%$ ,  $n = 22$ ,  $p = 0.0002$ , Figure 5B-D), and it hardly had any effect at 100  $\mu$ M ( $f = 59.0 \pm 5.0 \%$ ,  $n = 13$ ,  $p = 0.98$ ) (Figure 5D). This is consistent with D15 having a low affinity for its target. On the other hand, using 1 mM of D44 abolished endocytosis almost completely, ( $f = 20.6 \pm 5.2 \%$ ,  $n = 15$ ,  $p < 0.0001$ ). Even 100  $\mu$ M of either D44 or D30, a trimmed down version of D44 bearing the two SH3 binding motifs (Figure 4A), partially inhibited endocytosis ( $f = 41.4 \pm 9.6 \%$  and  $41.7 \pm 5.4 \%$ ,  $p$

= 0.03 and 0.04, respectively). Finally, the divalent peptides dD15-N and dD15-C also had a clearly increased efficiency over D15 (Figure 5B-D), with the C terminal version being the most potent D15-derived inhibitor of endocytosis ( $f = 13.3 \pm 3.7 \% n = 6, p < 0.0001$ ). The effects of the various conditions on CME measured with the ppH assay were consistent with the changes in cell capacitance, measured with patch-clamp in whole cell mode, which reflect the balance between exocytosis and endocytosis (Supplementary Figure 4F). Overall, the increased efficiency of D44 and divalent D15 peptides in inhibiting endocytosis in living cells is reminiscent of the *in vitro* behaviour described above. Thus, these data support a model in which dynamin binding partners are present in a multimeric configuration in the cellular context for efficient recruitment at endocytosis sites.

## Discussion

Taken together, the data presented here support the idea that dynamin-SH3 interactions rely on the presence of multiple interaction sites to achieve successful membrane scission.

We show that at least two class-II consensus SH3 interaction motifs have to be present in the C-terminal part of dynPRD for mutant dynamin to regulate dynamin recruitment and rescue the endocytic defects observed in dynamin TKO cells. The central B motif, from which the D15 is derived, is important but not essential; the C-terminal C motif appears to play a similar role. Interestingly, this second motif is only found in dynamin 2, which could explain its better ability to rescue CME in cell lines than the neuronal dynamin 1 (Liu et al., 2011) and the greater sensitivity of neuronal cells to D15 cytoplasmic dialysis (Yamashita et al., 2005). Similar to motif B (PSRPVRI), motif C also contains an extra arginine after the class II binding motif (PGVPSRR), making it a preferred ligand for amphSH3 (Grabs et al., 1997; Landgraf et al., 2004). However, we clearly show with TKO cell rescue experiments that isolated motifs cannot stably bind multivalent targets. We propose that adjacent SH3 binding motifs on dynPRD stabilize its binding to neighbouring multiple SH3 domains. One motif (B or C) shows specificity

for amphSH3 whereas the stabilizing motif may or may not show any specificity, but the proximity of binding sites is enough to stabilize the interaction by avidity effects.

Our second set of experiments with competing peptides is entirely consistent with this model. We showed that D15 alone was a poor binder to amphSH3 in either mono- (SUMO-amphSH3) or oligomeric (Ntr-bSUMO-amphSH3) forms, whereas both the elongated D44 peptide and the divalent D15 peptides bound with higher affinity to oligomeric amphSH3. Alternatively, D44 could bind amphSH3 with higher affinity because of additional motifs binding to other, non-canonical sites on a single SH3 domain, as shown for dynPRD binding to syndapin SH3 domain (Luo et al. 2016). However, it is unlikely to be the case here because the differential effect we observe takes place only with oligomeric SH3 constructs. Our in cellulo data were also consistent with these properties. Indeed, dialysing D44 or divalent D15 peptides inside 3T3 cells fully inhibited CCV formation whereas inhibition by monovalent D15 was only partial. To our knowledge, despite the recognized importance of multivalent interactions for the endocytic process (Schmid and McMahon, 2007), divalent peptides have never been used to interfere with endocytosis in living cells. Considering the moderate inhibitory activity of D15, the D44 and dD15 peptides described here appear to be better tools for this purpose. However, long peptides such as D44 are more difficult to obtain than shorter peptides such as D15 due to the inherent limitations of solid-phase peptide synthesis. In this context, divalent peptides present the advantage of being accessible with significantly less synthetic steps as compared to D44 (Sainlos et al., 2011) (see methods for details). We therefore propose that the importance of multimeric interactions for dynamic protein assemblies in cells, an emerging field in cell biology (Banani et al., 2017), can be deciphered using such tools.

Our results shed a new light on the mechanisms of dynamin recruitment to CCSs (Figure 6). Efficient recruitment of dynamin requires that multiple adjacent class II motifs on dynPRD interact simultaneously with multiple SH3 domains. Consequently, these multiple SH3 domains must be brought together, either in a single protein or through protein oligomerization. In vitro, dynPRD interacts with many SH3 domain containing proteins (Antonny et al., 2016) with distinct recruitment patterns relative to CCV formation (Taylor et al., 2011). Dynamin is recruited early at low levels in the formation of CCSs (Aguet et al., 2013; Taylor et al., 2011) mainly at the edge of the clathrin lattice (Sochacki et al., 2017).

Interestingly, intersectin has five SH3 domains, of which three can bind dynamin (Zamanian et al., 2003) and can thus interact with multiple motifs on dynPRD regardless of its oligomerization state. Moreover, intersectin is among the earliest proteins recruited to CCSs (Henne et al., 2010) and is also located at the edge of clathrin lattices (Sochacki et al., 2017), making it a prime candidate for an early interactor of dynamin. At later stages, dynamin accumulates rapidly to the neck of forming vesicles at the same time as endophilins, amphiphysins, and SNX9/18 (Taylor et al., 2011). All these proteins contain a single SH3 domain as well as a BAR domain. BAR domains form dimers that can bind to or induce curved membranes (Peter, 2004). Among those, amphiphysins are the most likely to be critical for dynamin function in CME because dialysis of amphSH3 has strong effects of CCV formation (Shupliakov, 1997; Simpson et al., 1999) and knock-down of amphiphysins has the strongest effects of these proteins on CME (Meinecke et al., 2013). We propose that as long as dynamin and amphiphysin are found in the cytoplasm as homo-dimers (Faelber et al., 2012; Peter, 2004), they cannot strongly bind to each other due to the low affinity of their interaction and because the two SH3 domains are too far apart. They would just form short-lived, transient complexes. However, when amphiphysin is recruited to the neck of vesicles thanks to its curvature sensing properties, its SH3 domains may rearrange in such a way that they would be in close proximity and made available for dynamin binding (see Mim et al., 2012 for a similar endophilin rearrangement). Whether amphSH3 domains are optimally placed to face dynPRD in a cellular environment remains unknown. The structure of dynamin has been solved by crystallography (Faelber et al., 2011; Reubold et al., 2015) or cryoEM (Chappie et al., 2011; Sundborger et al., 2014) in many different conformations but always without its unstructured PRD. Moreover, dynPRD binding to amphSH3 competes with an intramolecular interaction between its BAR and SH3 domains as was seen for other proteins involved in CME such as syndapin 1 (Rao et al., 2010) or endophilin A1 (Mim et al., 2012). Therefore, a reciprocal stabilisation of the interaction between dynamin and amphiphysin could occur through oligomerisation. The open configuration of amphiphysin would only be possible once the neck of the vesicle is tight enough for amphiphysin to form a scaffold around it. Dynamin would bind this multimeric scaffold, stabilising amphiphysin's new conformation. This would provide a seed for further recruitment of both proteins around the vesicle neck in a positive feedback mechanism. Consistent with this model is the observation that the start of dynamin burst recruitment ~20 s before scission coincides with that of amphiphysin and endophilin (Taylor

et al., 2011). Also, affecting dynamin recruitment kinetics in turn affects endophilin recruitment kinetics (Taylor et al., 2012). The coincidence of this precise geometry and the advent of avidity conferred by multimerisation as highlighted by this study therefore provide an elegant explanation for the timely accumulation of dynamin at the moment of membrane scission.

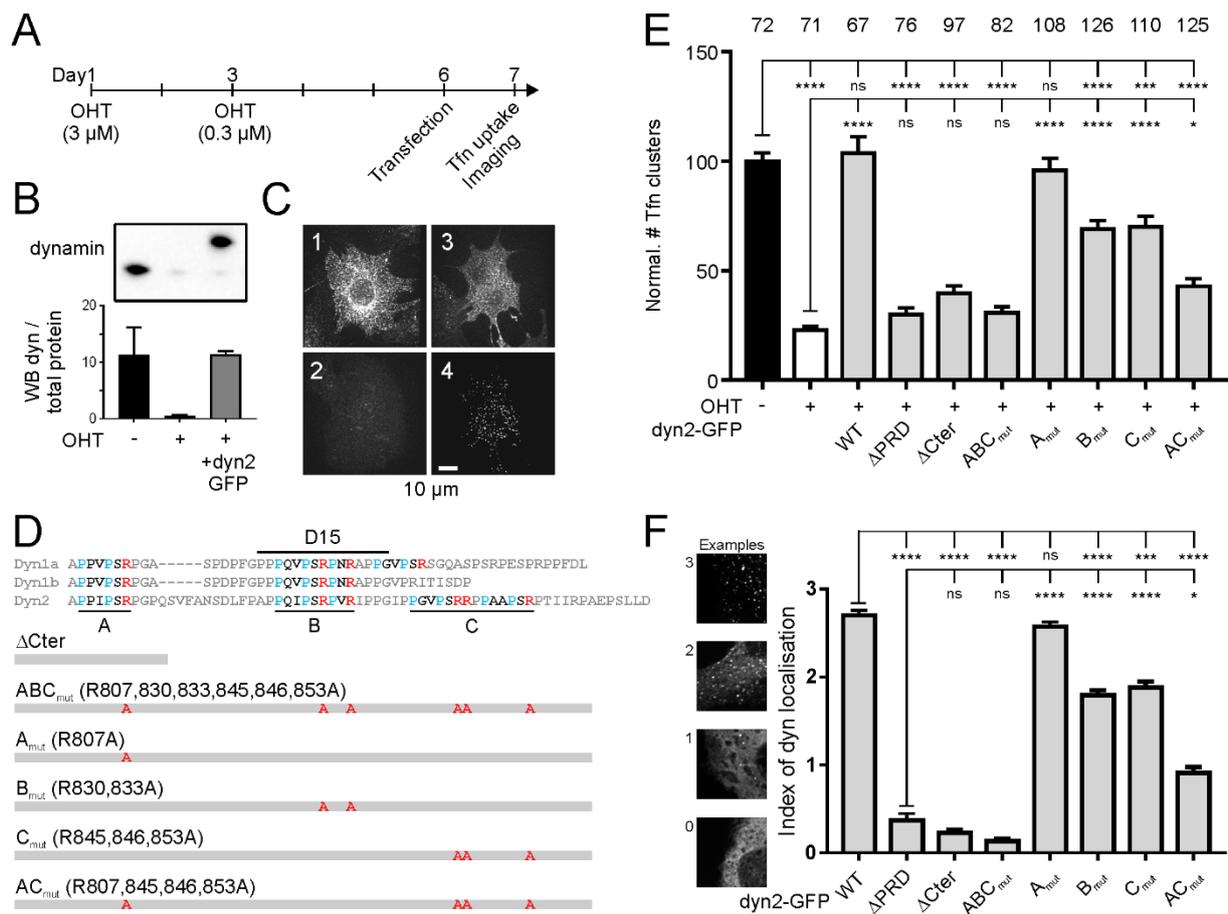
## References

- Aguet, F., Antonescu, C.N., Mettlen, M., Schmid, S.L., and Danuser, G. (2013). Advances in Analysis of Low Signal-to-Noise Images Link Dynamin and AP2 to the Functions of an Endocytic Checkpoint. *Dev. Cell* 26, 279–291.
- Antonny, B., Burd, C., Camilli, P.D., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., Ford, M., Frolov, V.A., Frost, A., Hinshaw, J.E., et al. (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J.* e201694613.
- Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., and Rosen, M.K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 285–298.
- Cao, H., Garcia, F., and McNiven, M.A. (1998). Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 2595–2609.
- Chappie, J.S., Mears, J.A., Fang, S., Leonard, M., Schmid, S.L., Milligan, R.A., Hinshaw, J.E., and Dyda, F. (2011). A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell* 147, 209–222.
- Doyon, J.B., Zeitler, B., Cheng, J., Cheng, A.T., Cherone, J.M., Santiago, Y., Lee, A.H., Vo, T.D., Doyon, Y., Miller, J.C., et al. (2011). Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 13, 331–337.
- Fabrini, R., De Luca, A., Stella, L., Mei, G., Orioni, B., Ciccone, S., Federici, G., Lo Bello, M., and Ricci, G. (2009). Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: a critical re-examination. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 10473–10482.
- Faelber, K., Posor, Y., Gao, S., Held, M., Roske, Y., Schulze, D., Haucke, V., Noé, F., and Daumke, O. (2011). Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature* 477, 556–560.
- Faelber, K., Held, M., Gao, S., Posor, Y., Haucke, V., Noé, F., and Daumke, O. (2012). Structural Insights into Dynamin-Mediated Membrane Fission. *Structure* 20, 1621–1628.
- Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Ferguson, S., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., Cremona, O., et al. (2009). Coordinated Actions of Actin and BAR Proteins Upstream of Dynamin at Endocytic Clathrin-Coated Pits. *Dev. Cell* 17, 811–822.
- Grabs, D., Slepnev, V.I., Songyang, Z., David, C., Lynch, M., Cantley, L.C., and De Camilli, P. (1997). The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J. Biol. Chem.* 272, 13419–13425.
- Grillo-Bosch, D., Rabanal, F., and Giralte, E. (2011). Improved Fmoc-based solid-phase synthesis of homologous peptide fragments of human and mouse prion proteins. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 17, 32–38.

- Henne, W.M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., and McMahon, H.T. (2010). FCHO Proteins Are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Science* 328, 1281–1284.
- Jockusch, W.J., Praefcke, G.J.K., McMahon, H.T., and Lagnado, L. (2005). Clathrin-Dependent and Clathrin-Independent Retrieval of Synaptic Vesicles in Retinal Bipolar Cells. *Neuron* 46, 869–878.
- Kaksonen, M., and Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 313–326.
- Käll, L., Canterbury, J.D., Weston, J., Noble, W.S., and MacCoss, M.J. (2007). Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* 4, 923–925.
- Landgraf, C., Panni, S., Montecchi-Palazzi, L., Castagnoli, L., Schneider-Mergener, J., Volkmer-Engert, R., and Cesareni, G. (2004). Protein Interaction Networks by Proteome Peptide Scanning. *PLoS Biol.* 2, e14.
- Liu, Y.-W., Neumann, S., Ramachandran, R., Ferguson, S.M., Pucadyil, T.J., and Schmid, S.L. (2011). Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E234–E242.
- Lundmark, R., and Carlsson, S.R. (2003). Sorting Nexin 9 Participates in Clathrin-mediated Endocytosis through Interactions with the Core Components. *J. Biol. Chem.* 278, 46772–46781.
- Luo, L., Xue, J., Kwan, A., Gamsjaeger, R., Wielens, J., von Kleist, L., Cubeddu, L., Guo, Z., Stow, J.L., Parker, M.W., et al. (2016). The binding of syndapin SH3 domain to dynamin proline-rich domain involves short and long distance elements. *J. Biol. Chem.* jbc.M115.703108.
- Lüscher, C., Xia, H., Beattie, E.C., Carroll, R.C., von Zastrow, M., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1999). Role of AMPA receptor cycling in synaptic transmission and plasticity. *Neuron* 24, 649–658.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 517–533.
- Meinecke, M., Boucrot, E., Camdere, G., Hon, W.-C., Mittal, R., and McMahon, H.T. (2013). Cooperative Recruitment of Dynamin and BIN/Amphiphysin/Rvs (BAR) Domain-containing Proteins Leads to GTP-dependent Membrane Scission. *J. Biol. Chem.* 288, 6651–6661.
- Merrifield, C.J., Perrais, D., and Zenisek, D. (2005). Coupling between Clathrin-Coated-Pit Invagination, Cortactin Recruitment, and Membrane Scission Observed in Live Cells. *Cell* 121, 593–606.
- Mim, C., Cui, H., Gawronski-Salerno, J.A., Frost, A., Lyman, E., Voth, G.A., and Unger, V.M. (2012). Structural basis of membrane bending by the N-BAR protein endophilin. *Cell* 149, 137–145.

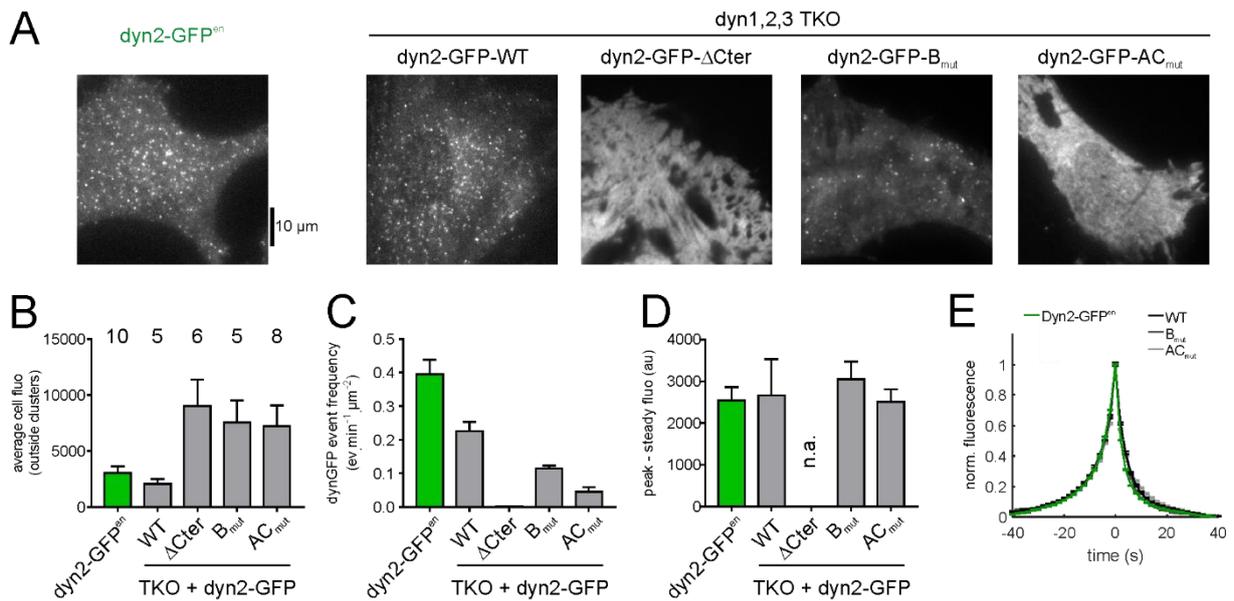
- Okamoto, M., Schoch, S., and Südhof, T.C. (1999). ESH1/Intersectin, a Protein That Contains EH and SH3 Domains and Binds to Dynamin and SNAP-25 A PROTEIN CONNECTION BETWEEN EXOCYTOSIS AND ENDOCYTOSIS? *J. Biol. Chem.* *274*, 18446–18454.
- Okamoto, P.M., Herskovits, J.S., and Vallee, R.B. (1997). Role of the Basic, Proline-rich Region of Dynamin in Src Homology 3 Domain Binding and Endocytosis. *J. Biol. Chem.* *272*, 11629–11635.
- Owen, D.J., Wigge, P., Vallis, Y., Moore, J.D.A., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (1998). Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J.* *17*, 5273–5285.
- Park, R.J., Shen, H., Liu, L., Liu, X., Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2013). Dynamin triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamin inhibitors. *J. Cell Sci.* *126*, 5305–5312.
- Peter, B.J. (2004). BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* *303*, 495–499.
- Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P.J., and Kelly, R.B. (1999). Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Mol. Biol. Cell* *10*, 501–513.
- Rao, Y., Ma, Q., Vahedi-Faridi, A., Sundborger, A., Pechstein, A., Puchkov, D., Luo, L., Shupliakov, O., Saenger, W., and Haucke, V. (2010). Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8213–8218.
- Reubold, T.F., Faelber, K., Plattner, N., Posor, Y., Ketel, K., Curth, U., Schlegel, J., Anand, R., Manstein, D.J., Noé, F., et al. (2015). Crystal structure of the dynamin tetramer. *Nature* *525*, 404–408.
- Ringstad, N., Nemoto, Y., and Camilli, P.D. (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: Binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 8569–8574.
- Sainlos, M., Tigaret, C., Poujol, C., Olivier, N.B., Bard, L., Breillat, C., Thiolon, K., Choquet, D., and Imperiali, B. (2011). Biomimetic divalent ligands for the acute disruption of synaptic AMPAR stabilization. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 81–91.
- Schmid, E.M., and McMahon, H.T. (2007). Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. *Nature* *448*, 883–888.
- Shen, Y., Rosendale, M., Campbell, R.E., and Perrais, D. (2014). pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. *J. Cell Biol.* *207*, 419–432.
- Shupliakov, O. (1997). Synaptic Vesicle Endocytosis Impaired by Disruption of Dynamin-SH3 Domain Interactions. *Science* *276*, 259–263.

- Sigismund, S., Confalonieri, S., Ciliberto, A., Polo, S., Scita, G., and Di Fiore, P.P. (2012). Endocytosis and Signaling: Cell Logistics Shape the Eukaryotic Cell Plan. *Physiol. Rev.* *92*, 273–366.
- Simpson, F., Hussain, N.K., Qualmann, B., Kelly, R.B., Kay, B.K., McPherson, P.S., and Schmid, S.L. (1999). SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat. Cell Biol.* *1*, 119–124.
- Sochacki, K.A., Dickey, A.M., Strub, M.-P., and Taraska, J.W. (2017). Endocytic proteins are partitioned at the edge of the clathrin lattice in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.*
- Solomaha, E., Szeto, F.L., Yousef, M.A., and Palfrey, H.C. (2005). Kinetics of Src Homology 3 Domain Association with the Proline-rich Domain of Dynamins: SPECIFICITY, OCCLUSION, AND THE EFFECTS OF PHOSPHORYLATION. *J. Biol. Chem.* *280*, 23147–23156.
- Sundborger, A.C., Fang, S., Heymann, J.A., Ray, P., Chappie, J.S., and Hinshaw, J.E. (2014). A dynamin mutant defines a superconstricted prefission state. *Cell Rep.* *8*, 734–742.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V., and De Camilli, P. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* *1*, 33–39.
- Taylor, M.J., Perrais, D., and Merrifield, C.J. (2011). A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLoS Biol.* *9*, e1000604.
- Taylor, M.J., Lampe, M., and Merrifield, C.J. (2012). A Feedback Loop between Dynamin and Actin Recruitment during Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLoS Biol.* *10*, e1001302.
- Yamashita, T., Hige, T., and Takahashi, T. (2005). Vesicle endocytosis requires dynamin-dependent GTP hydrolysis at a fast CNS synapse. *Science* *307*, 124–127.
- Zamanian, J.L., Kelly, R.B., and Pfeffer, S.R. (2003). Intersectin 1L Guanine Nucleotide Exchange Activity Is Regulated by Adjacent src Homology 3 Domains That Are Also Involved in Endocytosis. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1624–1637.

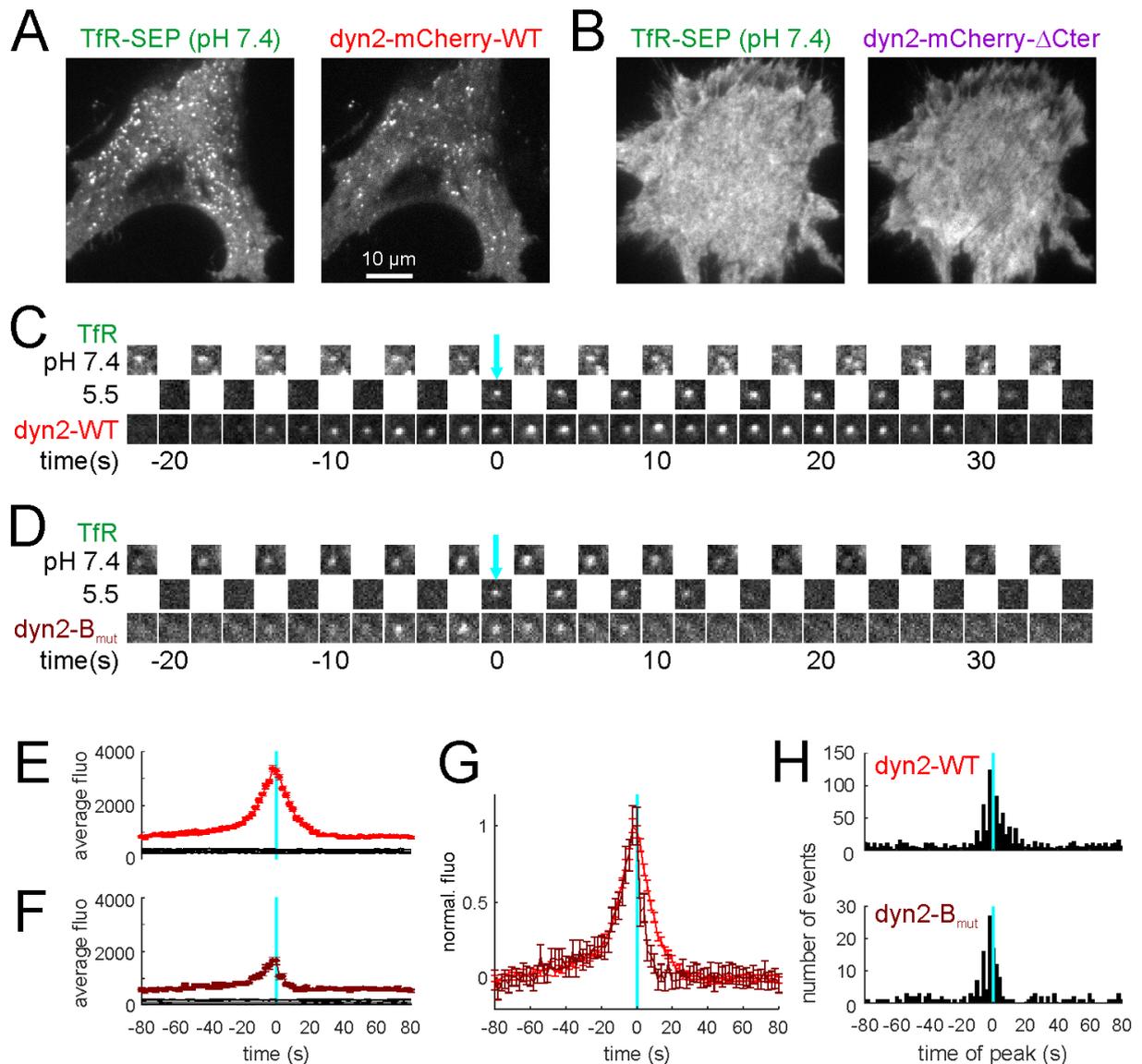


**Figure 1: Rescue of endocytosis in dynamin TKO cells with PRD mutant dynamins.** **A**, Protocol for dynamin knock-out and rescue. After 6 days of gene excision of the three dynamin genes following hydroxytamoxifen (OHT) treatment, cells are transfected with electroporation. Tfn uptake and imaging assays are performed the next day. **B**, Western blot with pan-dynamin antibody on untreated cells, cells treated with OHT or cells treated with OHT and transfected with dynamin2-GFP. Note the migration at higher molecular weight of dyn2-GFP. Bottom, quantification in three experiments of the WB signal normalized to the total amount of protein. See Supplementary Figure 4A for full gels and blots. **C**, Example images (red channel) of cells incubated with Tfn-A458 for five minutes, washed and fixed. (1) Not treated with OHT, (2) treated with OHT, (3) treated with OHT and transfected with dyn2-GFP. (4) GFP channel of the cell shown in (3). **D**, Sequences of the C terminal parts of the PRD of dyn1 (a and b splice variants) and dyn2, with the class-II SH3 binding motifs A, B and C indicated. Below, mutants of dyn2 used to rescue Tfn-A568 uptake with the corresponding mutations. **E**, Quantification of Tfn-A568 uptake, expressed as the density of detected clusters for cells treated with OHT and transfected with dyn2-GFP mutants as indicated. The number of cells imaged in four different experiments is indicated on top of each condition. The adjusted p values of 1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests are shown in Supplementary Table 2. **F**, Quantification of dyn2-GFP localization in transfected TKO cells. Each cell was evaluated blind with a score ranging from 0 (homogenous labelling) to 3 (punctuate labelling without homogenous), with intermediates of 1 (mostly homogenous with few clusters) and 2 (some

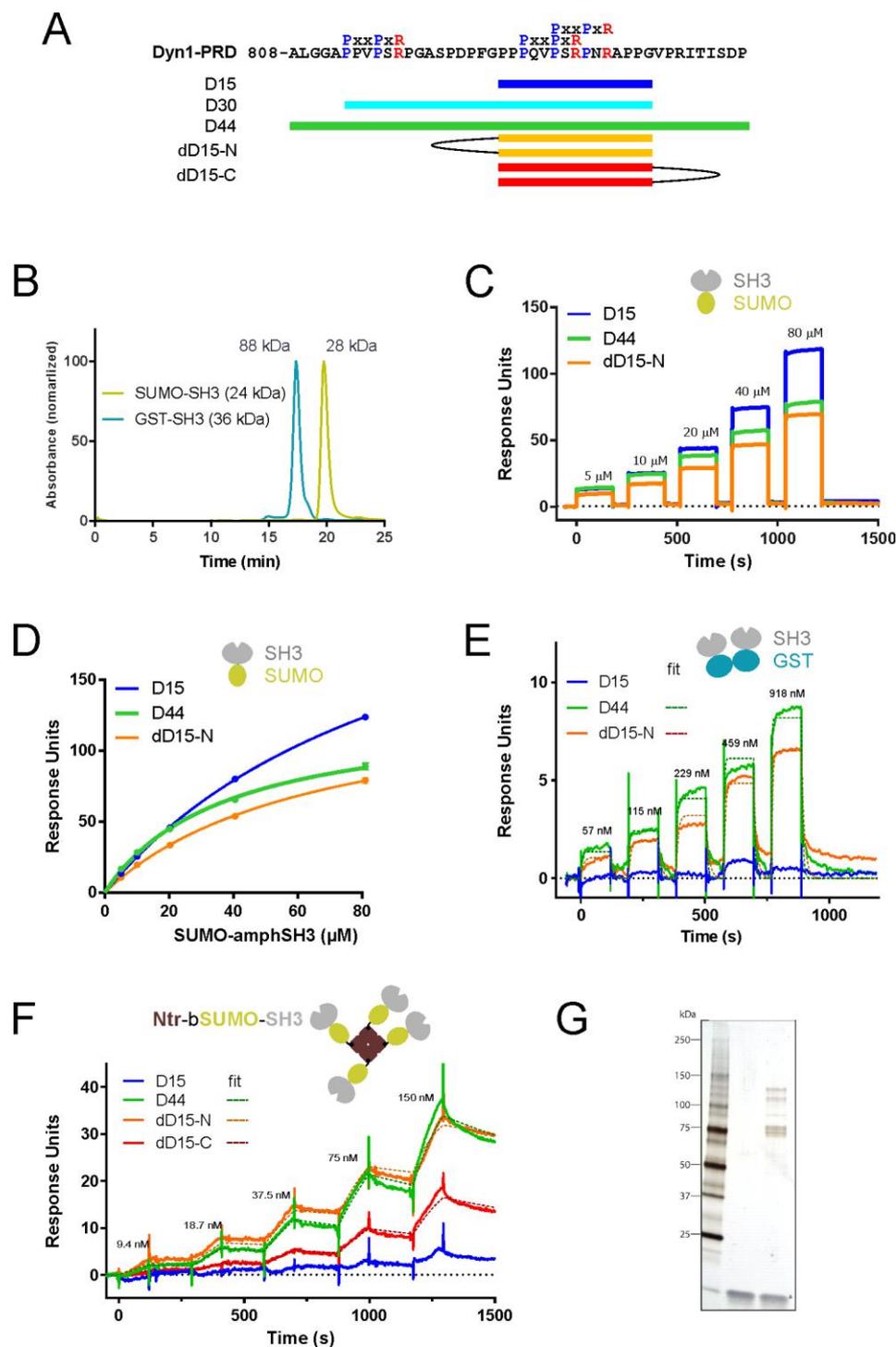
homogenous with distinct clusters). Examples in the left illustrate this scoring. The graphs show the average  $\pm$  SEM of scores for each dyn2 mutant.



**Figure 2: The frequency but not the kinetics of dyn2 recruitment events at nascent CCVs is affected in dynPRD mutants. A,** TIRF images of living SKMEL cells expressing dyn2-GFP in both endogenous loci (left) or dynamin TKO MEF cells transfected with the indicated dyn2-GFP mutants (right). **B,** Average fluorescence outside the dyn2-GFP clusters for the various dyn2-GFP mutants. The number of cells recorded is indicated at the top of the graph. **C,** dyn2-GFP recruitment event frequencies for the same cells as in B. **D,** Average amplitudes of peak dyn2-GFP events for the same cells as in B, except for cells transfected with dyn2-GFP- $\Delta$ Cter. **E,** Normalized average fluorescence of all the events detected, aligned to their peak fluorescence. The total number of events averaged was 36070 for dyn2-GFP<sup>en</sup> cells and 18678, 127, 5916 and 6116 for TKO cells transfected with dyn2-GFP-WT, dyn2-GFP- $\Delta$ Cter, dyn2-GFP-B<sub>mut</sub> and dyn2-GFP-AC<sub>mut</sub>, respectively.

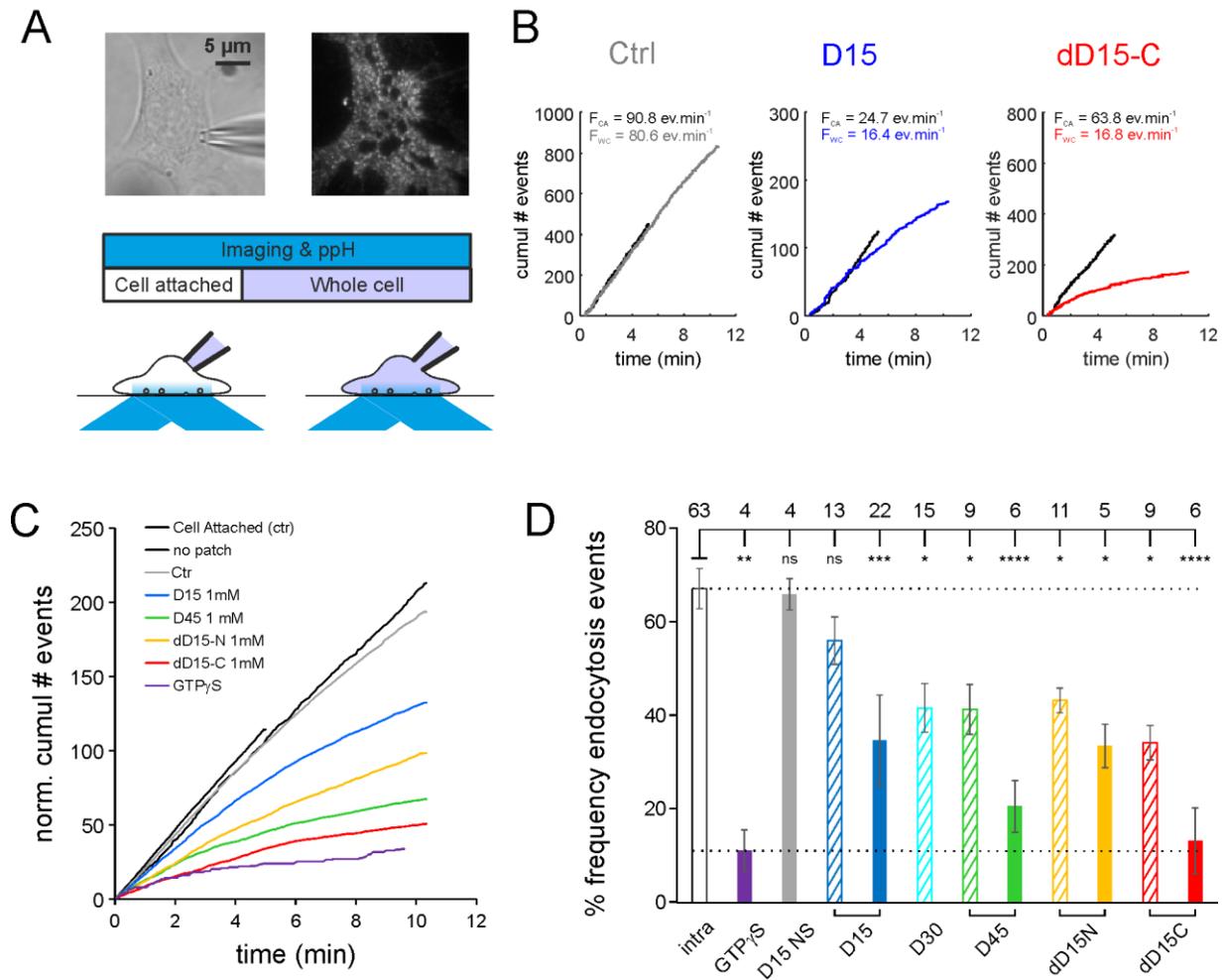


**Figure 3. The kinetics of dynamin recruitment to forming CCVs is not affected but its absolute quantity is reduced.** **A,B**, Images of a TKO cell co-transfected with TfR-SEP and dyn2-mCherry-WT (A) or dyn2-mCherry- $\Delta$ Cter (B). Note the punctuated pattern of both markers with dyn2-WT which becomes homogenous with dyn2 $\Delta$ Cter. **C**, Example of a scission event recorded in the cell shown in A. Note the transient recruitment of dyn2-mCherry-WT which peaks around time 0. **D**, Same as H for a TKO cell co-transfected with TfR-SEP and dyn2-mCherry-B<sub>mut</sub>. **E**, Average fluorescence of dyn2-mCherry of 1193 events recorded in 5 cells co-transfected with TfR-SEP and dyn2-mCherry-WT and aligned to the time of scission (cyan line). The black lines indicate 95% confidence intervals for significant recruitment. **K**, Same as E for 171 events recorded in 7 cells co-transfected with TfR-SEP and dyn2-mCherry-B<sub>mut</sub>. **L**, The curves in E,F are normalized to their peak. **M**, Histograms of peak dyn2 recruitment in single events.



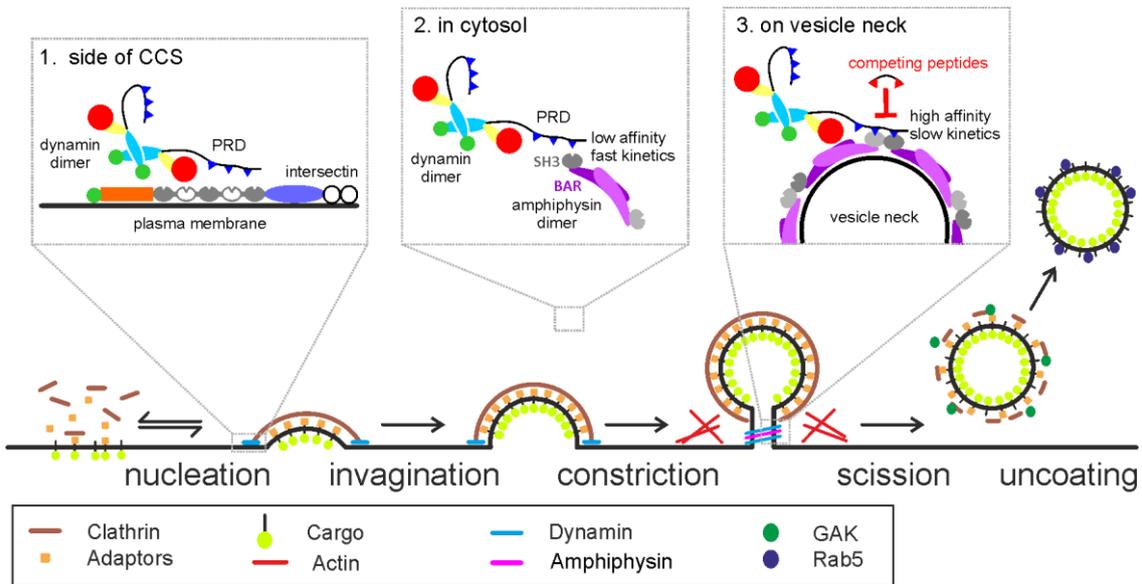
**Figure 4: Multimeric SH3 domains bind with high affinity to D44 and divalent but not monovalent D15 peptides.** **A**, Scheme of the peptides used in this study. Top, sequences of the last 44 residues of rat dynamin1 (splice variant b). **B**, Retention times of SUMO-SH3 and GST-SH3 measured by size exclusion chromatography. The theoretical molecular weights are indicated. For SUMO-SH3 the elution peak corresponds to 28 kDa, close to the expected monomer, whereas for GST-SH3 it corresponds to 88 kDa, close to the expected size of a dimer. **C**, Representative sensorgrams of SUMO-SH3 binding at indicated concentrations to immobilized peptides. Note the fast on and off rates for all peptides consistent with weak and

transient interactions. **D**, Steady-state  $K_{DS}$  calculated from the data in D (3 replicate experiments):  $102 \pm 2 \mu\text{M}$  (D15),  $37 \pm 2 \mu\text{M}$  (D44),  $66 \pm 3 \mu\text{M}$  (N-P3D15). **E**, Representative sensorgrams of GST-SH3 binding at indicated concentrations to immobilized peptides. The scheme on top (GST in blue, SH3 in gray) indicates that this protein likely forms dimers (see B). **F**, Representative sensorgrams of Ntr-bSUMO-SH3 binding at indicated concentrations to immobilized peptides. The scheme on top shows the multimeric complex formed by bSUMO-SH3 bound to tetrameric neutravidin (brown). Note the change in kinetics (slower off rates) for D44 and the multimeric peptides (dD15-N and dD15-C). **G**, Silver stain of rat brain lysate pull-down with no peptide (middle) or biotinylated dD15-N (right).



**Figure 5: D44 and divalent D15 peptides are more efficient than D15 to block CME monitored with the ppH assay.** **A**, Experimental design. Top, images of a 3T3 cell recorded with a patch-clamp electrode (seen on the transmitted light image, *left*) and transfected with TfR-SEP imaged with TIRF microscopy (*right*). The cells are recorded for at least 15 min with the ppH assay. In the first 5 min, the cell is in the cell attached configuration (*left*) and in the last 10 min in the whole cell configuration (*right*). **B**, Examples of recordings of cells with internal solutions containing no peptide (Ctrl, left), 1 mM D15 (middle) or 1 mM dD15-C (right). Black lines represent the cumulative number of detected endocytosis events over time in cell attached configuration. They are all straight lines, indicating that the event frequency remains constant during recording. This frequency  $F_{CA}$  is written on top of the graph. Lines in color represent the cumulative number of events in whole cell configuration. Note that at early time points these curves are tangential to the corresponding curves in cell attached, indicating the same endocytosis activity. In the example with the control solution, the slope of this curve remains constant with only a slight deflection towards the end of the recording. On the other hand, the deflections are much more marked with solution containing inhibitory peptides. The frequency  $F_{WC}$  in the last two minutes of the whole cell recording is indicated on top of the graphs. **C**, Averages of curves normalized to the corresponding cell attached recordings and displayed as in B for all the conditions tested in this study. **D**, Average  $\pm$  SEM of the ratio of

event frequency measured 8-10 min in whole cell over event frequency 3-5 min in cell attached for the same cell. The number of recordings for each condition is indicated on top of the graph. Recording solutions containing 100  $\mu$ M (*hatched bars*) or 1 mM (*plain bars*) of the indicated peptide.



**Figure 6: Model of dynamin recruitment to forming CCVs.** Model of dynamin recruitment by its PRD domain with SH3 containing proteins. 1. At early stages of CCV formation dynamin interacts with intersectin which has multiple dynamin interacting (gray) and non-interacting (white) SH3 domains. 2. In the cytosol, dynamin forms a dimer, as well as SH3 domain containing proteins such as amphiphysin. The SH3 domains of the dimer are too far apart to stabilize the interaction with the PRD via multiple binding motifs. 3. On the vesicle neck, two dimers of amphiphysin are arranged such that two SH3 domains are next to each other. This ensures high affinity of dynamin with this configuration enabling the fast recruitment of dynamin.

## Methods

### Peptide synthesis

**Abbreviations:** DCM: Dichloromethane; DHB: 2,5-Dihydroxybenzoic acid; DIPEA: N,N'-diisopropylethylamine; DMF: N,N-dimethylformamide; Fmoc: 9-fluorenylmethoxy-carbonyl; Fmoc-TTDS: [N1-(Fmoc)-1,13-diamino-4,7,10-trioxatridecan-succinamic acid; HBTU: 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate; HOBt: 1-hydroxybenzotriazole; MALDI: Matrix-assisted laser desorption ionisation; MeCN: Acetonitrile; MS: Mass spectrometry; NMP: N-methyl-2-pyrrolidone; RP-HPLC: Reverse-phase high performance liquid chromatography; Pbf: pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl; SPPS: Solid-phase peptide synthesis; TIPS: Triisopropylsilane; TFA: Trifluoroacetic acid

**Chemicals:** Fmoc-protected amino-acids were from GenScript USA Inc. HBTU, Fmoc-TTDS and Fmoc-Lys(N<sub>3</sub>)-OH were from Iris Biotech GmbH. HOBt, DIPEA, N-methylpiperidine, acetic anhydride, pyridine, biotin, 4-pentynoic acid, TIPS, TRIZMA base and DHB were from Sigma-Aldrich. TFA, MeCN, DCM, DMF and diethyl Ether were from Fisher scientific. Fmoc-Dab(Alloc)-OH was from Bachem AG. NMP was from Applied Biosystems.

**Procedure:** Monomeric peptides were synthesised at 0.05 mmol scale on Fmoc-NOVA PEG rink amide AM LL resin (Novabiochem) and dimeric peptides on PAL NovaSyn TG resin (Novabiochem). Amino-acids were assembled by automated SPPS on a CEM micro-waves Liberty-1 synthesiser (Saclay, France) except for C-terminally linked dimeric peptides. Coupling of PEG motifs and N-terminal derivatisations were also performed manually. For automated synthesis, Fmoc protecting groups were cleaved with 4-methylpiperidine in DMF (1:5 v/v) containing 0.1M HOBt using a combination of short (35 W, 75°C, 30s) and a long cycle (35 W, 70°C, 180s). Couplings of Fmoc-protected amino acids (0.2 M) were carried out in the presence of HBTU (0.25 M) and DIPEA (1M) using standard coupling cycles (20 W, 70°C, 300s, except for Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0 W, RT, 1500s followed by 20 W, 70°C, 300s). For the synthesis of D44, we evaluated a priori difficult couplings according to (Grillo-Bosch et al., 2011). We thus introduced a systematic double coupling on Y1, A2, L3, G5 (N-terminus amino acids) V37, P38, I40 and T41 (bulky amino acids). Other double couplings were then introduced empirically at positions P7, S11, S16, P22, P23, 33, P34, G36, D43 and P44. An acetylation step was systematically introduced after each amino-acid coupling in order to eliminate truncation products. For manual synthesis, Fmoc protecting groups were cleaved with 4-methylpiperidine in DMF (1:5 v/v, 1x1 min + 2x7 min) except for the final coupling of PEG motifs on N-terminally linked dimeric peptides for which the deprotection was performed using 4-methylpiperidine in NMP (1:5 v/v, 1x1 min + 4x5 min). Couplings of Fmoc-protected amino acid were carried out in the presence of HBTU/HOBt and DIPEA (5:5:10 eq, 1h30min). C-terminally linked dimeric peptides were obtained by generating two points of chain elongation with a Fmoc-Lys(Fmoc)-OH amino acid, whereas N-terminally linked dimeric

peptides were obtained by coupling a 7:3 mixture of Fmoc-Lys(N<sup>3</sup>)-OH and pentynoic acid followed by copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition in DMF/4-methylpiperidine (8:2) with CuI (5 eq), ascorbic acid (10 eq) and aminoguanidine (10 eq). N-free peptide resins were derivatised with acetyl groups or biotin. Acetylation was performed using 7 mL of a solution of 0.15M acetic anhydride and 0.15M pyridine in DMF (1h30min). Biotinylation was performed by first coupling Fmoc-TTDS-OH (3 eq) then biotin (3 eq). Both couplings were mediated by HBTU/ HOBt and DIPEA (3:3:6 eq, 1h30min). Acetylated peptides were used in living cells and for SPR experiments. Biotinylated peptides were used for affinity isolation from rat brain lysates and SPR experiments. . Peptides were cleaved from the resin for 3h using TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS (95:2.5:2.5) with mild orbital shaking and precipitated with cold diethyl ether. All crude peptides were resuspended in H<sub>2</sub>O containing a few drops of DMF and purified in a Waters 1525 semi-preparative RP-HPLC system equipped with a UV/Vis detector and a YMC C18, ODS-A /120, 250 × 20 mm. Purification was performed using a standard gradient of 5% MeCN containing 0.1% TFA for 5 min followed by an appropriate gradient of MeCN containing 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O for 40 min (1 mL.min<sup>-1</sup>). UV detection was performed at 220 and 280 nm. All peptides were obtained at more than 90% purity as judged by analytical RP-HPLC with the exception of N-P<sub>3</sub>-D15 (84.8 % purity). Masses were determined by MALDI-TOF spectroscopy in an UltraFlex III TOF-TOF (Bruker Daltonics). Peptide concentrations were determined by absorbance measurements at 280 nm in a UV-visible spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu) ( $\epsilon(Y) = 1490 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Peptides were lyophilised and stored at -80°C until use.

### **Affinity isolation assays**

Frozen adult Sprague-Dawley rat brains (2 x ~1.5g) were thawed in 20 mL ice cold modified RIPA buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM EDTA) containing a protease inhibitor mixture (1:1,000; Protease Inhibitor Cocktail set III; Calbiochem) for about 5 min and cut into small pieces. The tissues were homogenised using a glass/teflon homogeniser. Homogenates were centrifuged at 7,500 g for 25 min at 4 °C to remove cell debris. The supernatant was aliquoted and stored at -80 °C until the affinity-based isolation (pull-down) experiments were performed. Streptavidin-coated beads (Dynabeads M-280, Life Technologies) were washed three times and incubated for 15 min at room temperature (RT) in modified RIPA buffer supplemented with 0.1 % BSA. Rat brain lysates were incubated with the biotinylated peptide (or biotin as a negative control) for 10 min at RT before addition of the beads and further incubation for 5 min at RT. Beads were washed 5 times in RIPA buffer and transferred into new eppendorf tubes. For elution, acetylated ligands were added in excess to the bead suspension and incubated for 5 min at RT. The supernatant was kept for proteomics analysis and electrophoresis followed by silver staining after addition of fresh 6x sample buffer (ProteoSilver Silver Stain Kit, Sigma-Aldrich).

### **Proteomics analysis**

Samples were solubilized in Laemlli buffer and were deposited in triplicate onto SDS-PAGE. Separation was stopped once proteins have entered resolving gel. After colloidal blue staining,

bands were cut out from the SDS-PAGE gel and subsequently cut in 1 mm x 1 mm gel pieces. Gel pieces were destained in 25 mM ammonium bicarbonate 50% MeCN, rinsed twice in ultrapure water and shrunk in MeCN for 10 min. After MeCN removal, gel pieces were dried at room temperature, covered with the trypsin solution (10 ng/ $\mu$ L in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), rehydrated at 4 °C for 10 min, and finally incubated overnight at 37 °C. Spots were then incubated for 15 min in 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  at room temperature with rotary shaking. The supernatant was collected, and an  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}/\text{HCOOH}$  (47.5:47.5:5) extraction solution was added onto gel slices for 15 min. The extraction step was repeated twice. Supernatants were pooled and dried in a vacuum centrifuge to a final volume of 25  $\mu$ L. Digests were finally resuspended in 25  $\mu$ L of formic acid (5%, v/v) and stored at -20 °C.

Peptide mixture was analyzed on a Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to a nanospray LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA). Ten microliters of peptide digests were loaded onto a 300- $\mu$ m-inner diameter x 5-mm  $\text{C}_{18}$  PepMap™ trap column (LC Packings) at a flow rate of 30  $\mu$ L/min. The peptides were eluted from the trap column onto an analytical 75-mm id x 15-cm  $\text{C}_{18}$  Pep-Map column (LC Packings) with a 4–40% linear gradient of solvent B in 35 min (solvent A was 0.1% formic acid in 5% MeCN, and solvent B was 0.1% formic acid in 80% MeCN). The separation flow rate was set at 300 nL/min. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 2-kV needle voltage. Data were acquired in a data-dependent mode. MS scans ( $m/z$  300-1700) were recorded at a resolution of  $R = 70\,000$  (@  $m/z$  400) and an AGC target of  $5 \times 10^5$  ions collected within 500 ms. Dynamic exclusion was set to 30 s and top 6 ions were selected from fragmentation in CID mode. MS/MS scans with a target value of  $1 \times 10^4$  ions were collected in the ion trap with a maximum fill time of 200 ms. Additionally, only +2 and +3 charged ions were selected for fragmentation. Others settings were as follows: no sheath nor auxiliary gas flow, heated capillary temperature, 200 °C; normalized CID collision energy of 35% and an isolation width of 3  $m/z$ .

Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against a subset of the 2018.01 version of UniProt database restricted to *Rattus norvegicus* Reference Proteome Set (29,961 entries). Spectra from peptides higher than 5000 Da or lower than 350 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor and peptide fragments was set to 10 ppm and 0.6 Da respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+16 Da) and carbamidomethylation of cysteines (+57 Da) were considered respectively as variable and fixed modifications. Two missed trypsin cleavages were allowed. Peptide validation was performed using Percolator algorithm (Käll et al., 2007) and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% False Positive Rate at peptide level.

Raw LC-MS/MS data were imported in Progenesis Q1 for Proteomics 2.0 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K). Data processing includes the following steps: (i) Features detection, (ii) Features alignment across the 6 samples, (iii) Volume integration for 2-6 charge-state ions, (iv)

Normalization on feature median ratio, (v) Import of sequence information, (vi) Calculation of protein abundance (sum of the volume of corresponding peptides), (vii) A statistical test was performed and proteins were filtered based on  $p$ -value $<0.05$ . Noticeably, only non-conflicting features and unique peptides were considered for calculation at protein level. Quantitative data were considered for proteins quantified by a minimum of 2 peptides.

### **SH3 domain production**

SUMO-Amph1-SH3 and GST-Amph1-SH3 were generated by subcloning murine Ampiphysin1 SH3 domain residues 607-686) from pAmph1-mCherry (kind gift from C. Merrifield, Addgene 27692) using BamHI and XhoI restriction sites into a modified pET-SUMO bacterial expression vector (Life Technologies) incorporating a TEV cleavage site and a multiple cloning site following the SUMO tag or a modified pGEX-4T-2 vector incorporating a TEV cleavage site before the gene of interest. The biotinylated SUMO-Amph1-SH3 was obtained by subcloning the gene from SUMO-Amph1-SH3 using BsrGI and XhoI restriction sites into a homemade vector derived from pET-24a that presents a biotin acceptor peptide (Avitag) and a His10 tag prior to the gene of interest. The recombinant SH3 domains (SUMO and GST fusions) were produced in BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL E. coli cells by auto-induction at 16 °C and purified by affinity (Ni-NTA resin) and size exclusion chromatography as previously described (Sainlos et al., 2011). The biotinylated SUMO-Amph1-SH3 fusion was produced in BL21-CodonPlus (DE3) E. coli cells in presence of a plasmid encoding for BirA in a pACYC-Duet-1 vector and biotin (50  $\mu$ M) by auto-induction at 16 °C and purified as above. Proteins were stored at -80 °C in surface plasmon resonance running buffer until use. Analytical size exclusion chromatography were performed on a HiLoad Superdex200 Increase 10/300 GL column with PBS + 0.01% Tween-20 as an eluent at a flow rate of 0.75 mL.min<sup>-1</sup>.

### **Surface plasmon resonance measures and analysis**

Experiments were performed at 25 °C with a Biacore™ X100 or T200 apparatus (Biacore™, GE healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). The experiments were performed on biotin CAPture kit sensor chips (Biacore™). 50-90 RU of biotinylated peptides were immobilised by injecting solutions prepared at 5-10 nM in running buffer (10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM sodium chloride and 0.01% Tween-20). Importantly, for all experiments, density of the monovalent D15 peptide (bound RU) was about two-fold superior to the ones of divalent or D44 peptides to rule out artefact due to high surface density of the ligand. One flow-cell was left blank and used as a reference. For single cycle kinetics experiments, captured targets and analyte samples were prepared in running buffer and injected at 5 and 30  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> respectively. The capture of streptavidin and regeneration of the functionalised surface was achieved following the manufacturer's recommended protocols. Sensorgrams were double-referenced using Biacore evaluation software (Biacore). No points were removed prior to data fitting. Spikes still present after the double-referencing process had no influence on the analysis. The kinetic data were analysed using a 1:1 Langmuir binding model of the

BIAevaluation software with the bulk refractive index (RI) kept constant and equal to 0 and the mass transfer constant ( $t_c$ ) kept constant and equal to  $10^8$ . In the case of fast association and dissociation rate constants that prevented reliable kinetics analysis, the curves were thus exploited using equilibrium analysis to obtain the dissociation equilibrium constants in GraphPad Prism (GraphPad Software v7.02 for Windows) by fitting the data with the one-site binding hyperbola formula

$$Y = \frac{B_{\max} * X}{K_D + X}$$

where Y is the response (in RU),  $B_{\max}$  is the response value at maximal binding,  $K_D$  is the affinity constant to be determined and X is the protein concentration.

### **Dynamin2 mutant design**

Dynamin 2 (human dynamin2bb according to the nomenclature of (Cao et al., 1998)) plasmids were based on the Dyn2-mCherry construct from Taylor et al. 2011 (Addgene 27689). We generated dyn2-GFP and dyn2-mCherry constructs used in this study in which the GFP/mCherry tag is relocated before the PRD (residue 740) with linkers composed of six residues (GTSGSS). We first generated an unlabeled dyn2 construct by PCR in which we introduced a stop codon at the end of the dynamin ORF. We then generated by PCR a Linker+GFP/mCherry which we inserted into the dyn2 vector with the In-Fusion HD kit (Clontech). Dyn2-GFP- $\Delta$ Cter and Dyn2-GFP- $\Delta$ PRD were generated introducing a stop codon at positions 807 (after motif A) or 740 (before the PRD), respectively. Single mutation GFP constructs (Dyn2-GFP  $A_{mut}$ ,  $B_{mut}$  and  $C_{mut}$ ) were generated by directed mutagenesis. Double mutation Dyn2-GFP  $AC_{mut}$  was generated sequentially by directed mutagenesis. The Dyn ABC $_{mut}$  was generated by inserting the artificially synthesized PRD (Eurogentec) containing these mutations into the wildtype construct by In-Fusion. All constructs were verified by sequencing.

### **Cell culture and transfection**

NIH 3T3 cells (ECACC 93061524) were cultured in DMEM supplemented with 1% sodium pyruvate, 1% glutamax and 10% fetal calf serum (Invitrogen). Cells were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> until use and subcultured every 2 to 4 days for maintenance up to passage 20. Cells were transfected with 1.5  $\mu$ g of TfR-SEP plasmid 24 hours prior to imaging and patch clamp. Care was taken to find the right balance between sufficient fluorescent signal to allow for proper imaging and reasonable overexpression to diminish potential saturation artefacts. Best results were obtained using Fugene 6 (Promega) as the transfection reagent but Lipofectamine 2000 (Invitrogen) has also been used in this study due to a temporary arrest of Fugene 6 production by the provider. All transfections were performed according to the manufacturers' recommendations. 4-8 hours after transfection, cells were seeded at a density of  $\sim 70,000$  cells. $ml^{-1}$  on 18 mm glass coverslips coated with poly-L-lysine (3 min application of

0.1 mM polylysine (Sigma P2636) in borate buffer, pH 8.0 followed by a quick rinse in PBS) and used the next day.

The mouse embryonic fibroblast cell line obtained from tamoxifen inducible triple dynamin conditional mice (dynamin TKO cells<sup>13</sup>) was a kind gift from Pietro De Camilli (Yale School of Medicine, New Haven, CT). Cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 1% sodium pyruvate, 1% glutamax and 10% fetal calf serum (Invitrogen). Dynamin TKO was induced by the application of 3  $\mu$ M Hydroxytamoxifen (OHT, Sigma) for 2 days, then 0.3  $\mu$ M for 4 more days before transfection. Cells were transfected by nucleofection with the kit MEF 1 and the program MEF T20 (Lonza, Switzerland) by mixing 3  $\mu$ g of DNA (dynamin construct and TfR-SEP if applicable) with  $10^6$  cells. After electroporation, cells were plated on 4-6 18 mm glass coverslips coated with fibronectin (50 nM, Sigma) and equilibrated in culture medium. Cells were used one day after for transferrin uptake assay or imaging. Complete dynamin knock-out and dyn2-GFP re-expression was verified by Western Blot (WB) with a pan dynamin antibody (Santa Cruz sc-6401). Transfection efficiency was estimated by counting the cells with DAPI staining and the transfected cells with dyn2-GFP fluorescence. It was  $46 \pm 9$  % in three separate experiments. Therefore, because the amount of expression of dyn2-GFP-WT in TKO cells estimated by WB was similar to the one in untreated (WT) cells (Figure 3B), we conclude that TKO cells transfected with dyn2-GFP-WT have about 2-fold overexpression of dynamin compared to WT cells. On the other hand, there was in the range of expression obtained here no correlation between the level of dyn2-GFP-WT and A568-Tfn uptake (Supplementary Figure 4B).

SK-MEL-2 cell clone Ti95 (Dnm2-GFP<sup>en</sup> all edited) was a kind gift from David Drubin (University of California, Berkeley, CA). Cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 1% sodium pyruvate, 1% glutamax and 10% fetal calf serum (Invitrogen). Cells were plated on poly-L-lysine coated 18 mm glass coverslips and imaged the next day.

### **Live cell imaging**

Imaging was performed at 34-37°C on an Olympus microscope (Olympus IX71 or IX83) equipped with an inverted Apochromat 60x oil objective of numerical aperture 1.49 in combination with a 1.6x magnifying lens; or with a 100x objective of numerical aperture 1.49 (Olympus). Samples were excited in TIRF illumination (Olympus IX2RFAEVA illuminator) with a 473 nm laser source (Cobolt). Emitted fluorescence was filtered with a 525/50m filter (Chroma Technology). Images were acquired by an electron multiplying charge coupled device camera (EMCCD QuantEM:512SC, Roper Scientific) controlled by the software MetaVue 7.8 (Molecular Devices). Two-colour imaging was performed with a co-aligned 561 nm laser (Cobolt) with the same TIRF angle as the 473 nm laser. Emitted fluorescence was filtered with a 605/52m filter (Chroma Technology). Red and green fluorescence images were obtained 200 ms apart using a filter wheel (Lambda 10-3, Sutter Instruments). To correct for x/y distortions between the two channels, images of fluorescently labelled beads (Tetraspeck, 0.2  $\mu$ m; Invitrogen) were taken before each experiment and used to align the two channels. Time lapse images were acquired at 0.5 Hz with an integration time of 100 ms.

**ppH assay** Fast solution exchange was controlled by electro-valves (Lee company) connected to a theta glass pipette (TG150, Harvard Apparatus) pulled to  $\sim 100\text{-}\mu\text{m}$  tip size using a vertical puller (Narishige, World Precision Instruments) placed above the recorded cell. Cells were alternatively perfused with HEPES or MES buffered saline solutions (HBS/MBS) containing (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 0.4 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 1 D-glucose and 20 HEPES or MES. The pH was adjusted to 7.4 or 5.5 using NaOH and osmolarity to 310–315 mOsm.L<sup>-1</sup> with NaCl.

**Combined patch-clamp and imaging** Cells were patched with pipettes made of borosilicate glass (GC150F, Harvard Apparatus) and pulled with a vertical Narishige puller (World Precision Instruments). The solution contained (in mM): 130-140 KCH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>, 1 EGTA, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 10-20 HEPES, 4 ATP (sodium or magnesium salt), 0.4 Na-GTP (or GTPyS when indicated), 5 phosphocreatine and 3 sodium ascorbate. pH was adjusted to 7.2 using KOH and osmolarity to  $\sim 300$  mOsm.L<sup>-1</sup>. Sodium ascorbate was omitted in earlier recordings but was added for better stability. Chloride ions either came from 2 mM KCl, 10 mM NaCl or 4 mM MgCl<sub>2</sub> (when Na-ATP was used) in various trials. All salts were purchased from Sigma-Aldrich. Cells were voltage-clamped at -60 mV with an EPC10 amplifier (HEKA) with series resistance and cell capacitance estimation every 4 s in the whole cell mode. The digital triggers of the amplifier were used to drive the electrovalves for pH changes. Cell viability and dialysis efficiency were made sure of by monitoring three parameters throughout the recording using the Patchmaster software (HEKA): series resistance should remain below 10 M $\Omega$  and holding current should remain above -100 pA. If either of these criteria was not respected (except holding current for recordings in GTPyS, see Supplementary Figure 3D), the recording was not considered for analysis. On a given experimental day at least one control recording (*i.e.* without any peptide) was performed to ensure recording quality. All these recordings were pooled in the 'control' condition ( $n = 63$  on 42 experimental days). The nature of the peptide tested was unknown from the experimenter until the end of the recordings and analysis.

### **Image analysis and data representation**

The detection, tracking, and quantification of endocytic events was performed using scripts developed previously and updated in Matlab 2017 (Mathworks)(Taylor et al., 2011). Images were sorted according to the pH (7.4 or 5.5) into two movies. These two movies were segmented using multidimensional image analysis (MIA; developed for Metamorph by JB Sibarita, Bordeaux, France) with fixed optimized parameters. Objects appearing in pH 5.5 images were then considered *candidate* CCVs if they were visible for more than 3 frames (8 to 12 s), if their signal to noise ratio was high enough, and if a cluster pre-existed where they appeared for at least 5 frames (20 to 24 s) in pH 7.4 images (Supplementary Figure 2B). Importantly, this automated method of detection had been characterised as missing  $\sim 30\%$  of all events but with a low percentage of false positives ( $\sim 20\%$ )(Shen et al., 2014; Taylor et al., 2011), making it ideal for comparative studies over large datasets. However, to estimate better the inhibition by peptides, we wanted to make sure that the degree of false positives were kept as low as possible without reviewing all the events by eye. We thus developed a Support Vector Machine (SVM) type neural network by supervised learning. We used a dataset

of 26 recordings obtained in 6 experimental sessions with 9631 candidate events reviewed by two different operators (MR and DP), leading to 7763 *bona fide* endocytic events. This gives  $19.1 \pm 0.1$  % of false positives, a percentage virtually identical to previous estimates (Shen et al., 2014; Taylor et al., 2011). The inputs of the SVM were sets of 15x15 pixel images centred on the candidate event, 5 frames before and 6 frames after the candidate event is detected, i.e.  $15 \times 15 \times 11 = 2475$  input values (pixel values) per candidate event. The output was binary, 'accepted' or 'rejected' (Supplementary Figure 2C,D). Once trained, the SVM model could sort correctly all events used for training. We tested it further with 7 recordings with 1224 candidate events sorted by the user in 1124 *bona fide* events. The SVM sorted 1095 *bona fide* events ( $98.4 \pm 2.0$  % of the number of events accepted by the user). Finally  $93.5 \pm 1.1$  % were the same as the events accepted by the users. We conclude from this analysis that the SVM trained by the 26 recordings is able to discriminate *bona fide* events with the same accuracy as a human operator, and probably with better consistency. In conclusion, we developed a fully automated analysis workflow to assess quantitatively the endocytic activity of cells in real time.

The cumulative frequency plots presented in Figure 2B,C were obtained by plotting event detections against time. For each recording, the frequency of events in both cell attached and whole cell recordings were normalised to the basal frequency of the cell as monitored in cell attached configuration. In other words, the curves were normalised so that the number of detections at the 70<sup>th</sup> frame of cell attached recording (280 s) would be set to 100. In this way, several cells submitted to the same treatment could be pooled into a single curve despite a great variability in their basal endocytic activity. The effect of a blocker was then measured as

$$\left( \frac{F_{WC}([8 - 10])}{F_{CA}([2 - 4])} \right) * 100$$

where F is the frequency of events in the indicated time interval (in minutes) and the subscript is the recording mode in which it is being measured (CA: cell attached, WC: whole cell).

The recruitment of dyn2-GFP was analysed by segmentation and tracking as for TfR-SEP recordings. Objects that could be tracked for more than 3 frames (6 s) were retained for further analysis. The fluorescence value at each time point represents the average intensity in a 2 pixel (300 nm) radius circle around the centre of mass of the object to which the local background intensity is subtracted. This local background is estimated in an annulus (5 pixels outer radius, 2 pixels inner radius) centred on the region to be quantified as the average intensity of pixel values between the 20th and 80th percentiles (to exclude neighbouring fluorescent objects). The frame of maximum intensity is used as the reference (time 0) for aligning and averaging all traces. Before (resp. after) tracking of an object the fluorescence is measured at the location of the first (resp. last) frame with the object tracked. The quantification of TfR-SEP (at pH 7.4 and 5.5) and dyn2-mCherry was performed as in in the same manner using the coordinates of TfR-SEP at pH 5.5 (vesicles) and explained in detail in (Taylor et al., 2011). Briefly, two colour alignment was performed using the bead image taken

before the experiment. Correction for bleed through was performed by minimizing the difference between the dyn2-mCherry fluorescence values at the two pH with a green to red bleed through factor. Finally, 95% confidence intervals for significant recruitment were obtained by shifting the real event coordinates within the cell mask 200 times and computed fluorescence on these shifted coordinates.

### **Transferrin uptake assay and quantification**

TKO cells were starved in pre-warmed HBS for 10 min, then incubated in cold (4 °C) HBS containing 10 µg/ml of transferrin Alexa 568 (Tfn-A568, Thermo Fischer). Cells were then incubated at 37 °C for 5 min for endocytosis to occur. Afterwards, cells were washed in cold HBS, then in cold acetate buffer (pH 4.5) for 2 min to strip Tfn-A568 remaining on the cell surface, rinsed, and fixed with paraformaldehyde (4% in PBS, 37 °C) for 15 minutes. Cells were then rinsed several times in PBS and kept at 4°C until imaging. Fixed cells were then imaged with a spinning disk confocal microscope with a stack of 6 images separated by 0.5 µm encompassing the bottom part adhering to the coverslip with laser and camera parameters kept constant for the whole set of conditions. We used the maximal projection of the z-stack for quantification. For each cell, we traced around the dyn-GFP image (when applicable) a mask of the cell, as well as a background region with no cell. In non-transfected the mask was traced around the Tfn-A568 image. We detected Tfn-A568 clusters by wavelet segmentation. For each cell we computed the average fluorescence, the number of clusters and the cell surface. These numbers were normalized to 100 for the control condition (no OHT induction) for each of four independent internalization assays. The distribution of dyn-GFP was scored for each cell as entirely punctuate (1), punctuate on a homogenous background (2), mostly homogenous with some puncta (3), or entirely homogenous (4)(see Figure 3F for illustrations). All data processing and scoring was performed blind.

### **Statistical analysis**

Data is presented as average  $\pm$  SEM unless otherwise stated. Differences between conditions were tested by a one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. Dyn2-GFP localization scores were compared with Kruskal-Wallis non parametric test followed by Dunn's multiple comparison tests. Variations of  $C_m$  during whole cell recordings were tested with Student's paired T tests. All values were calculated with Prism 7 (Graphpad). P values are displayed in the Supplementary Table 3.





## **Inventory of Supplementary Data**

Supplementary Figure 1: The degree of expression of dynamin mutants does not correlate with internalized transferrin.

Supplementary Figure 2: Synthesis and characterization of divalent peptides

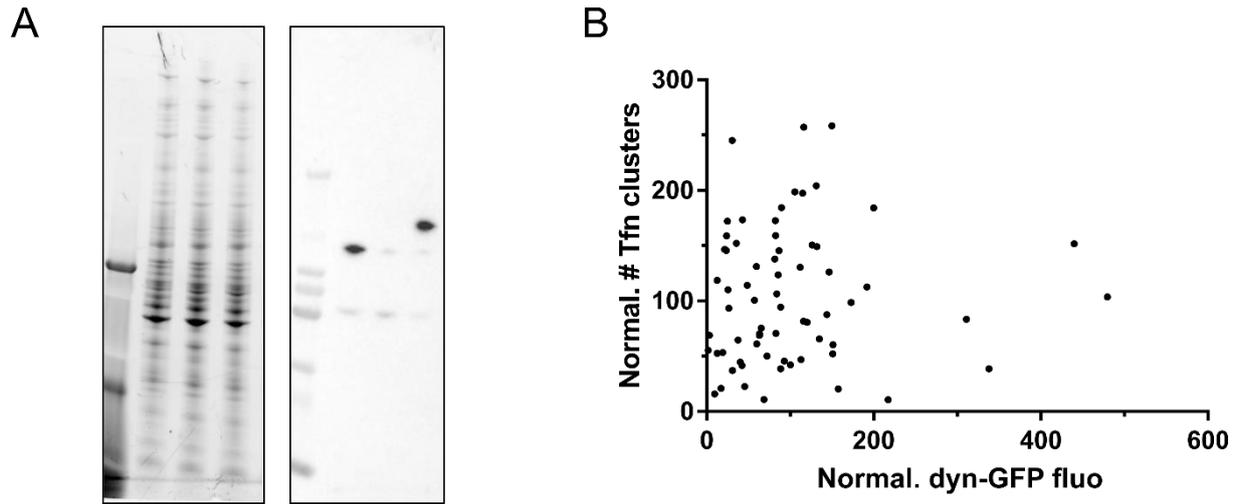
Supplementary Figure 3: Workflow of automated analysis of ppH data (SVM for final validation)

Supplementary Figure 4: Characteristics of the whole cell recordings in the different conditions of this study.

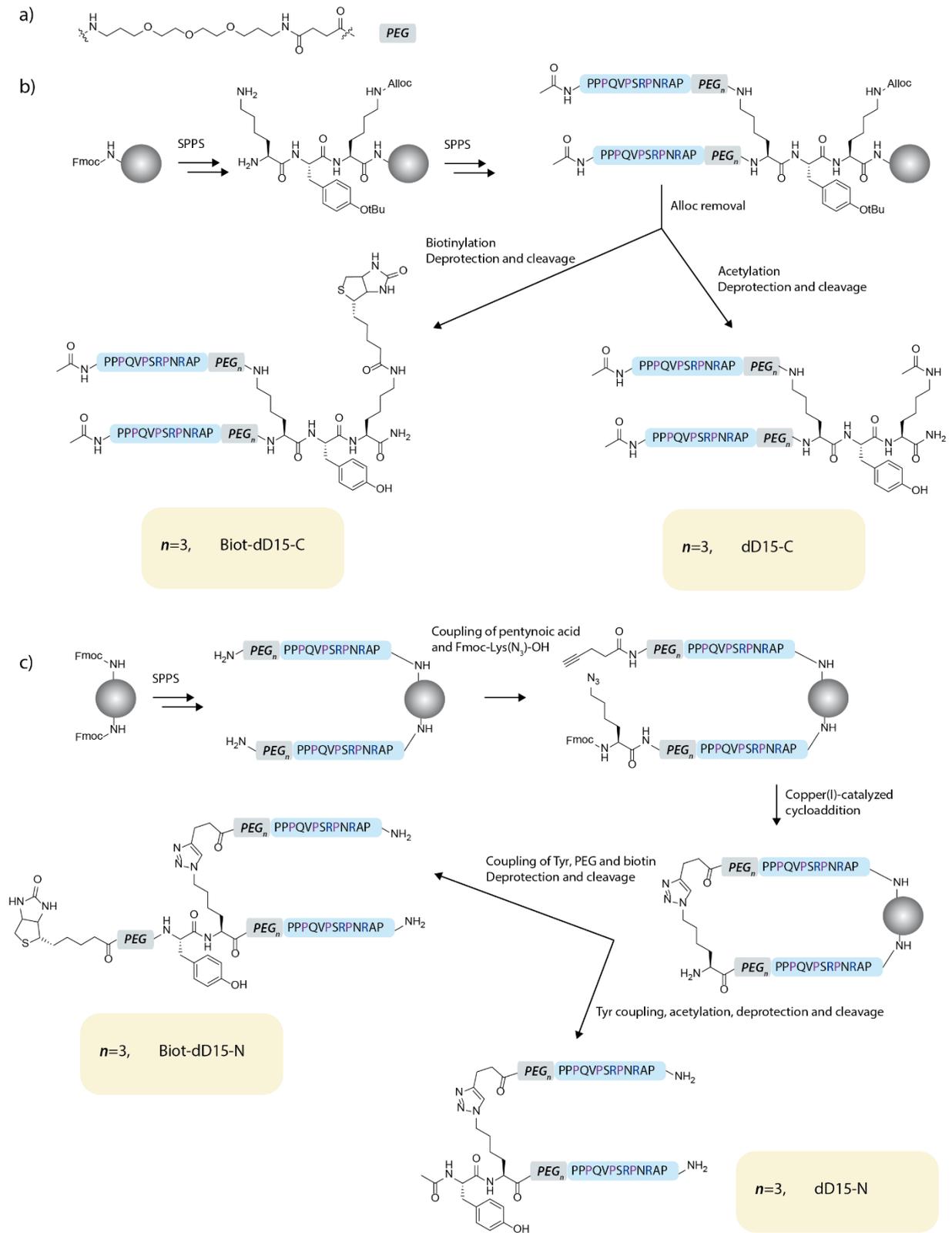
Supplementary Table 1: characteristics of the divalent peptides

Supplementary Table 2: Proteins identified by mass spectrometry after dD15-N pull down

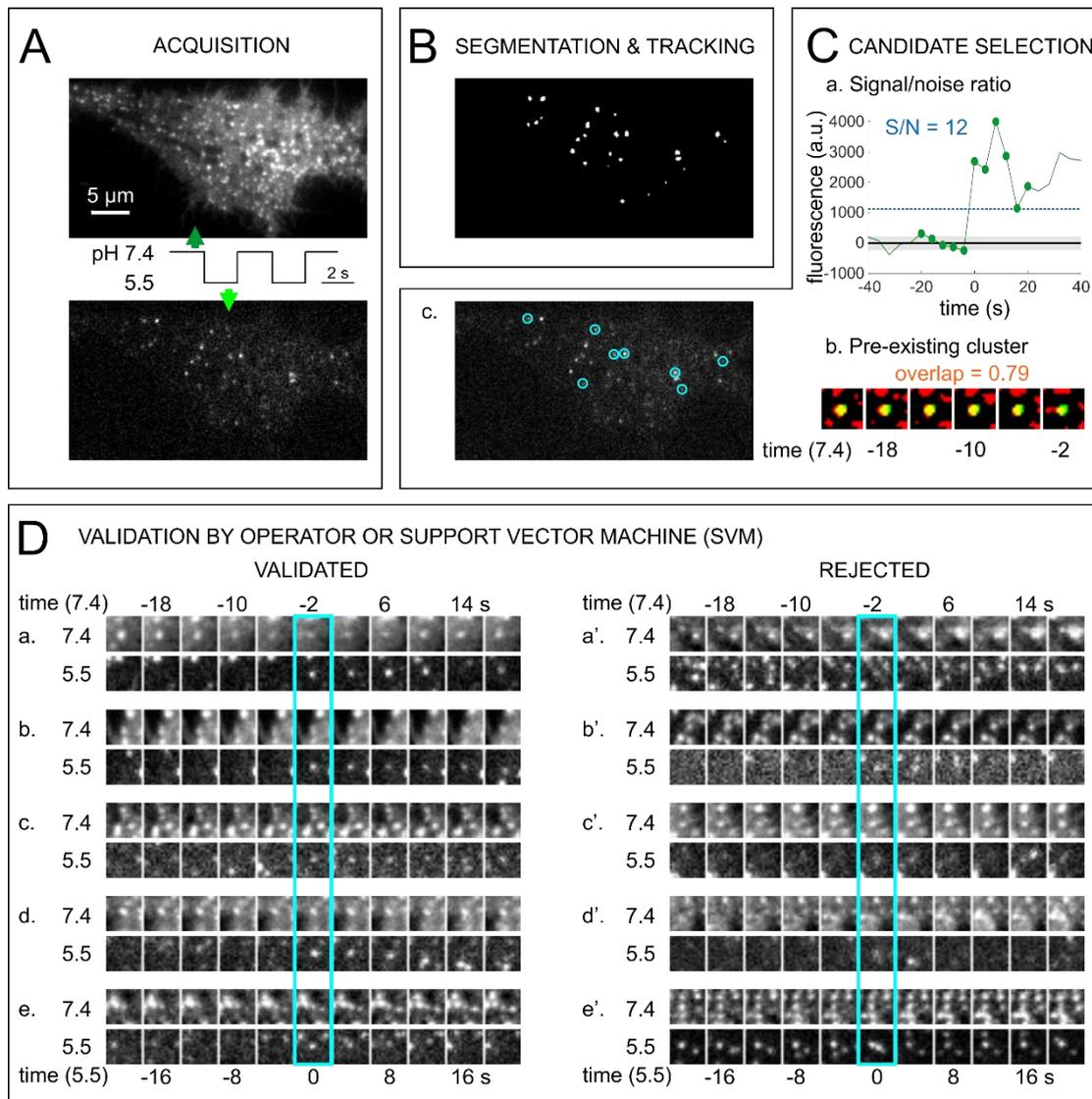
Supplementary Table 3: P values for the statistical tests used in Figures 1 and 5.



**Supplementary Figure 1: The degree of expression of dynamin mutants does not correlate with internalized transferrin.** **A**, Full blots corresponding to Figure 1B. Left, stain free detection of total protein. Lane 1, size marker; lanes 2-4, untreated, OHT-treated and OHT-treated + dyn2-GFP-WT transfected lysates respectively. Right, corresponding blot revealed with anti-dynamin antibody. **B**, The fluorescence of each TKO cell transfected with dyn2-GFP-WT was measured as the average in the mask normalized to 100 for each of 4 experimental sessions. There was no significant correlation between the two parameters (Pearson  $r = 0.058$ ;  $p = 0.64$ )

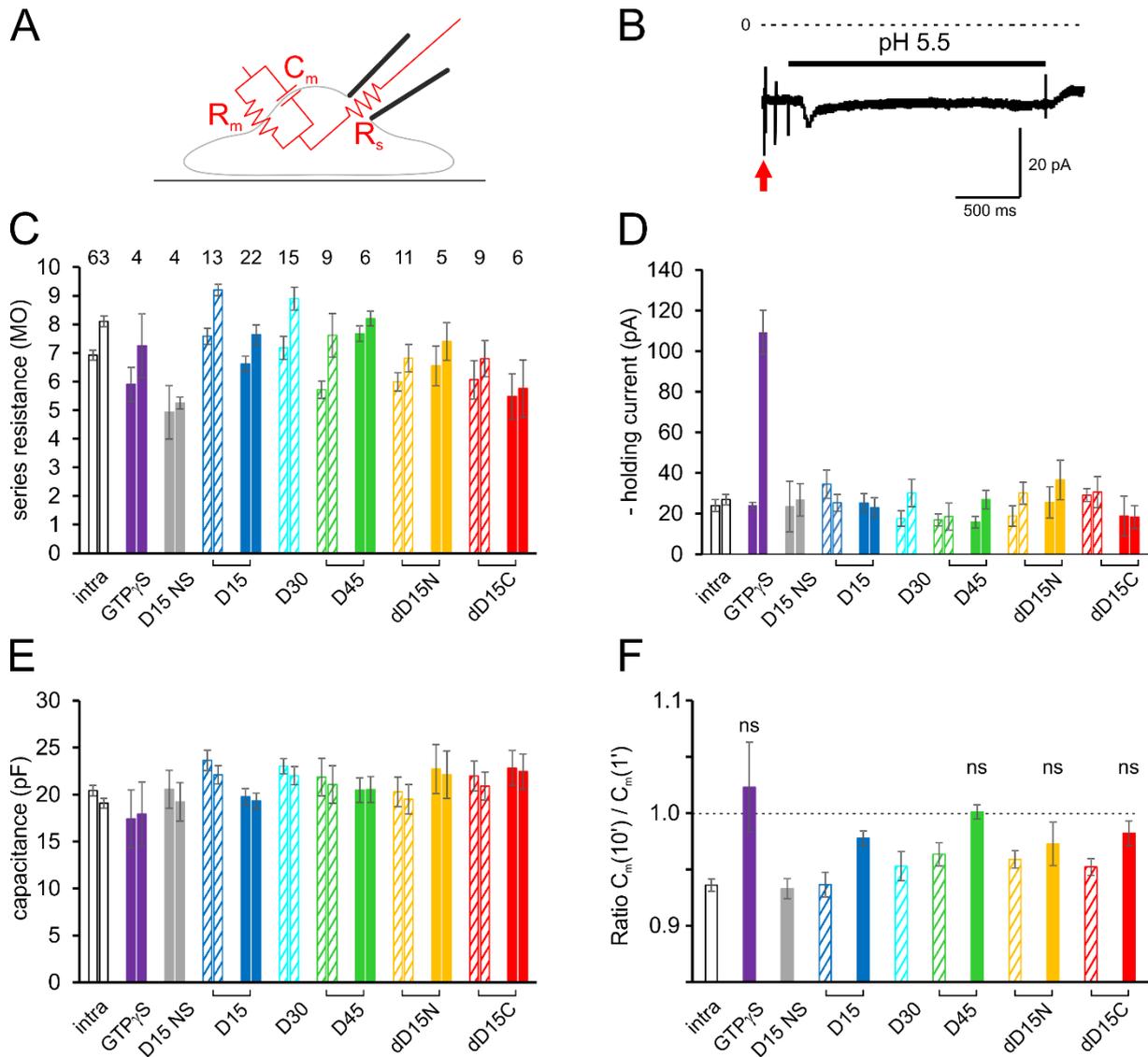


**Supplementary Figure 2:** Synthesis and structure of the divalent peptides. a) Chemical structure of the PEG residue. b) Synthetic schemes and structure of the C-terminally linked divalent peptides. c) Synthetic schemes and structure of the N-terminally linked divalent peptides.



**Supplementary Figure 3: Workflow of automated analysis of ppH data.** The four steps (A-D) leading to the characterization of scission events. **A**, Acquisition of images alternatively at pH 7.4 and pH 5.5. Two consecutive images are shown. The image at pH 5.5 is shown with 8x higher brightness than the one at pH 7.4. **B**, Segmentation and tracking of clusters visible at pH 5.5 on the image shown in A. **C**, Selection of candidate events based on two criteria. a. Signal/noise ratio. The average fluorescence in a circle of 2 pixels radius centered on the center of mass of the segmented object is plotted for each frame before and at the start of segmentation (time 0). The noise is estimated as the average  $\pm$  std before detection (black line, average; gray shading, std). An event is qualified as candidate if the fluorescence at detection divided by the noise estimate (S/N) is bigger than 5. The example (corresponding to event a. in panel D) has S/N = 12.0. b. Pre-existing cluster at pH 7.4. In segmented images, the location of the event (green) is compared to the clusters of TfR visible at pH 7.4 (red) for the five frames preceding the event. The fraction of green pixels overlapping with red (appearing in yellow) gives an estimate of the colocalization of the candidate vesicle with a parent cluster. An event is qualified as candidate when this fraction is greater than 0.2. For the displayed example (event a. in Panel D) the fraction overlap is 0.79. c. The cyan circles mark the clusters segmented in B which passed the criteria. **D**, Final event validation by a human operator or

the trained SVM. Left, gallery of events which were validated by a human operator. In all cases (a-e) the acid resistant spot (vesicle) is clearly visible and can be tracked. Right, gallery of events which were selected by the first screen described in C but subsequently rejected by a human operator. In cases a', d' and e' the acid resistant spot cannot be tracked consistently and in cases b' and c' it is barely above background. The choices made for validation and rejection, together with 9621 others, have served to train the SVM.



**Supplementary Figure 4: Characteristics of the whole cell recordings in the different conditions of this study.** **A**, Scheme of the equivalent electrical circuit of a cell recorded in the whole cell configuration. The electrical circuit in *red* is estimated by a voltage pulse (*red arrow* in **B**) and compensated by the patch clamp amplifier. Series resistance ( $R_s$ ) depends on the pipette resistance and the access to the cell cytoplasm. It reflects the ability of the pipette solution containing the blocking peptides to diffuse into the cell. Membrane capacitance ( $C_m$ ) is proportional to the plasma membrane surface. Membrane resistance ( $R_m$ ) is inversely proportional to the number of open channels. **B**, Example of a current recording of a cell held in voltage clamp at  $-60$  mV. The holding current is  $-21$  pA. The application of solution at pH 5.5 evokes a current of less than 5 pA. Fast transient currents reflect the response to the test voltage step (*red arrow*,  $-5$  mV, 10 ms, see **A**) and the electrical artefacts of electro-valve openings to exchange the extracellular solutions. **C**, Series resistance  $R_s$  for each recording condition (same cells as in Figure 5D), during the 1<sup>st</sup> minute (left) and the 10<sup>th</sup> minute (right) of whole cell recording.  $R_s$  were maintained below 10 M $\Omega$  throughout the recording and do not differ between conditions as compared to the control condition (one way ANOVA and Tukey multiple comparison tests). **D**, Same as **C** for holding current. There was no significant difference between conditions (one way ANOVA and Tukey's multiple comparison tests)

except for GTP $\gamma$ S at the 10<sup>th</sup> minute where the holding current was much larger ( $p < 0.0001$ ). This is likely due to the activation of GTP dependent trimeric G proteins which activate various channels in the presence of GTP $\gamma$ S, thereby increasing the holding current. **E**, Same as C for membrane capacitance  $C_m$ . There were no differences between conditions (one way ANOVA and Tukey multiple comparison tests). **F**, Ratios of  $C_m$  recorded during the 10<sup>th</sup> minute of recording over  $C_m$  recorded during the 1<sup>st</sup> minute. The variation in  $C_m$  indicates the balance between exocytosis and endocytosis. In control conditions, the relative membrane capacitance slightly but significant decreases:  $C_m(10')/C_m(1') = 0.936 \pm 0.006$  ( $p < 10^{-13}$  paired t-test). If endocytosis is blocked,  $C_m$  would be expected to stop decreasing or even increase. In four conditions (GTP $\gamma$ S, D44 1 mM, dD15-N 1mM, dD15-C 1 mM) there was no significant decrease in  $C_m$  ( $p = 0.49$ ;  $0.67$ ;  $0.27$ ;  $0.14$ , respectively). These four conditions correspond to the strongest decrease in endocytic event frequency measured with the ppH assay (see Figure 2D). All graphs indicate average  $\pm$  SEM.

Name	Sequence	Formula	Mass (m/z) <sup>a</sup>		Rt (min), [purity] <sup>b</sup>
			Expected M	Obtained [M+H] <sup>+</sup>	
Ac-D15	Ac-YPPPQVPSRPNRAPPG-CONH <sub>2</sub>	C <sub>80</sub> H <sub>123</sub> N <sub>25</sub> O <sub>21</sub>	1769,9	1771,0	20.8 [93%]
Biot-D15	Biot-PEG-YPPPQVPSRPNRAPPG-CONH <sub>2</sub>	C <sub>102</sub> H <sub>161</sub> N <sub>29</sub> O <sub>27</sub> S	2256,2	2257,2	ND
Ac-D44	Ac-YALGGAPPVPSRPGASDPDFGPPQVPSRPNRAPPGVPRITISDP-CONH <sub>2</sub>	C <sub>207</sub> H <sub>322</sub> N <sub>60</sub> O <sub>58</sub>	4576,4	4576,3	26.1 []
Biot-D44	Biot-PEG-YALGGAPPVPSRPGASDPDFGPPQVPSRPNRAPPGVPRITISDP-CONH <sub>2</sub>	C <sub>229</sub> H <sub>360</sub> N <sub>64</sub> O <sub>64</sub> S	5062,7	5062,5	ND
Ac-N-D30	Ac-YPPVPSRPGASDPDFGPPQVPSRPNRAPPG-CONH <sub>2</sub>	C <sub>147</sub> H <sub>221</sub> N <sub>43</sub> O <sub>40</sub>	3228,7	3229,3	24.4 [92%]
dD15-N		C <sub>249</sub> H <sub>418</sub> N <sub>64</sub> O <sub>73</sub>	5473,1	5471,2	24.5 [93%]
Biot-dD15-N		C <sub>257</sub> H <sub>430</sub> N <sub>66</sub> O <sub>74</sub> S	5657,2	5658,4	24.9 [92%]
dD15-C		C <sub>244</sub> H <sub>405</sub> N <sub>65</sub> O <sub>71</sub>	5382,0	5385,1	24.8 [85%]
Biot-dD15-C		C <sub>266</sub> H <sub>443</sub> N <sub>69</sub> O <sub>77</sub> S	5868,3	5868,1	24.7 [87%]

**Supplementary Table 1: Characterization of the synthesized peptides used in this study**

Supplementary Table 2: Proteomics analysis of the proteins interacting with dD15-N.

Name	#SH3 domain	BAR domain	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	ANOVA (p)	Max fold change	Description	Accession
<b>SH3 domain-containing proteins (known Dynamin partners)</b>									
SH3bp1	3	NO	89	84	264.8	1.2E-04	207.5	SH3 domain-containing, histone-binding protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Sh3bp1 PE=1 SV=2 - [SH3K1_RAT]	Q92C93;AA00H2UHD08;M0R827
Intersectin-2	5	NO	85	82	245.0	2.6E-04	118.9	Intersectin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Itsn2 PE1 SV=2 - [IMOR7Ab_RAT]	M0R7Ab
Intersectin-1	5	NO	20	17	52.3	1.3E-05	60.7	Intersectin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Itsn1 PE1 SV=3 - [D3ZV52_RAT]	D3ZV52;F1M823;O9VW19
Amphiphysin	1	YES	20	19	49.2	2.8E-04	40.7	Amphiphysin OS=Rattus norvegicus GN=Amph PE=1 SV=1 - [AMPH_RAT]	O08838;AA00G2JK32;AA00G2K5Z4;F1LPP0;Q68FR2
Bin1 (Amphip2)	1	YES	18	17	42.0	1.1E-03	70.2	Myc box-dependent-interacting protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Bin1 PE=1 SV=1 - [BIN1_RAT]	O08839;DAAMP1;F1LWX1;Q5HZA7
Endophilin-A1	1	YES	9	6	22.7	4.7E-03	53.5	Endophilin-A1 OS=Rattus norvegicus GN=Sh3bp2 PE=1 SV=2 - [SH3G2_RAT]	O35179
Snx4.8	1	NO	5	5	10.2	2.9E-04	16.1	Sonping nexin OS=Rattus norvegicus GN=Snx4.8 PE=1 SV=1 - [D3Z238_RAT]	D3Z238
Endophilin-A2	1	YES	5	2	10.1	2.8E-03	1.7	Endophilin-A2 OS=Rattus norvegicus GN=Sh3bp1 PE=1 SV=1 - [SH3G1_RAT]	O35964
<b>SH3 domain-containing proteins (other)</b>									
CD2-3ap	3	NO	52	51	125.5	8.5E-06	124.5	CD2-associated protein OS=Rattus norvegicus GN=Cd2ap PE=1 SV=2 - [CD2AP_RAT]	F1LH58
SH3d19	4	NO	22	22	55.7	1.5E-03	42.9	SH3 domain-containing 19 OS=Rattus norvegicus GN=Sh3d19 PE=1 SV=1 - [D3Z850_RAT]	D3Z850;D3ZV20
<b>CCP-related proteins</b>									
Eps15l1	0	NO	92	92	252.9	1.5E-05	196.9	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1 OS=Rattus norvegicus GN=Eps15l1 PE=1 SV=3 - [D3ZIR1_RAT]	D3ZIR1
Hsp98	0	NO	23	20	62.0	7.8E-03	15.6	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Rattus norvegicus GN=Hsp98 PE=3 SV=3 - [D4AA53_RAT]	D4AA53;AA00G2LUT0;AA00G2JV13;F1LZ1;M0R8M9;M0RCB1;P0DMW0;P14659;P55063;P63018
CHC	0	NO	25	25	59.5	1.3E-04	22.7	Clathrin heavy chain OS=Rattus norvegicus GN=Chc PE=1 SV=1 - [F1M779_RAT]	F1M779;P11442
AP2a1	0	NO	24	18	56.2	2.1E-05	28.6	AP-2 complex subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Ap2a1 PE=1 SV=1 - [D3ZUV8_RAT]	D3ZUV8
AP2a2	0	NO	22	16	50.3	1.3E-03	13.8	AP-2 complex subunit alpha OS=Rattus norvegicus GN=Ap2a2 PE=1 SV=1 - [Q66HM2_RAT]	Q66HM2;AA00G2K5Z4;F1L8484
AP2b1	0	NO	17	17	40.9	5.4E-07	40.0	AP-2 complex subunit beta OS=Rattus norvegicus GN=Ap2b1 PE=1 SV=1 - [A2B21_RAT]	P62944;AA00G2KXZ2;G3V9N8;P52303
AP2m1	0	NO	7	7	15.4	9.4E-04	25.5	AP-2 complex subunit mit OS=Rattus norvegicus GN=Ap2m1 PE=1 SV=1 - [A0A1407AH5_RAT]	AA0A1407AH5;P84092
Dnm1	0	NO	2	2	4.9	1.1E-02	27.4	Dynammin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Dnm1 PE=1 SV=2 - [DYNL_RAT]	P21575;AA00ADMV48;AA00ADMV49;P39052
<b>Cytoskeleton proteins</b>									
Actg1	0	NO	13	5	36.3	2.1E-01	2.2	Actin, cytoplasmic 2 OS=Rattus norvegicus GN=Actg1 PE=1 SV=1 - [ACTG_RAT]	P62259;AA00G2K3K2;P60711
Tubb3	0	NO	14	2	30.9	3.8E-01	1.2	Tubulin beta-3 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb3 PE=1 SV=1 - [TBB3_RAT]	Q4QR84;M0R886
Tubb4a	0	NO	13	2	30.1	6.6E-03	43.4	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubba PE=1 SV=1 - [B47C2_RAT]	B47C2
Tubb5	0	NO	11	2	28.9	2.5E-03	18.0	Tubulin beta-5 chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb5 PE=1 SV=1 - [TBB5_RAT]	P63897
Tubb2a	0	NO	12	3	28.3	1.6E-03	75.4	Tubulin beta-2A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubb2a PE=1 SV=1 - [TBB2A_RAT]	P83108;Q3KRE8
Tubata	0	NO	11	4	26.4	1.5E-02	13.3	Tubulin alpha-1A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubata PE=1 SV=1 - [TBA1A_RAT]	P63270;AA00H2UHM7;F1LUM5;Q68FR8;Q6AV56;Q6AVZ1;Q6P9Y9
Actg2	0	NO	9	2	22.7	3.2E-01	2.3	Actin, gamma-enteric smooth muscle OS=Rattus norvegicus GN=Actg2 PE=2 SV=1 - [ACTH_RAT]	P62269;AA00G2K4M6;P62738;P68035;P68136
Tubata	0	NO	10	3	20.3	1.4E-02	14.5	Tubulin alpha-4A chain OS=Rattus norvegicus GN=Tubata PE=1 SV=1 - [TBA4A_RAT]	Q5XIF6
Capz1	0	NO	3	2	6.3	3.9E-02	23.0	F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Rattus norvegicus GN=Capz1 PE=1 SV=1 - [CAZ1_RAT]	B2GUZ5
<b>Other proteins</b>									
Calcoo1	0	NO	16	16	38.3	2.4E-03	11.9	Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Calcoo1 PE=2 SV=1 - [CACO1_RAT]	Q66HRE;AA00G2K0S1;AA01B0GW3
Hspas5	0	NO	11	8	30.1	3.8E-02	4.1	78 kDa glucose-regulated protein OS=Rattus norvegicus GN=Hspas5 PE=1 SV=1 - [GRP78_RAT]	P06761
Rundc3a	0	NO	7	7	20.0	5.9E-04	15.0	RUx domain-containing 3A OS=Rattus norvegicus GN=Rundc3a PE=1 SV=1 - [F1LR29_RAT]	F1LR29
Hsp99	0	NO	7	6	17.2	3.2E-04	42.1	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Rattus norvegicus GN=Hsp99 PE=1 SV=3 - [GRP75_RAT]	P48721;F1M953
Amylia	0	NO	6	6	14.4	1.4E-01	2.8	Alpha amylase OS=Rattus norvegicus GN=Amy1a PE=1 SV=3 - [E9PSQ1_RAT]	E9PSQ1;AA00G2K6T1;E9P517;G3V844;P00689
Atpl3a3	0	NO	3	3	6.0	1.6E-03	33.4	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 OS=Rattus norvegicus GN=Atpl3a3 PE=1 SV=2 - [AT1A3_RAT]	P06687;P06685;P06686
Ubc	0	NO	2	2	5.9	5.5E-01	1.2	Polyubiquitin-C OS=Rattus norvegicus GN=Ubc PE=1 SV=1 - [UBC_RAT]	Q63429;F1LML2;F1LUG9;F1M927;P0CC51;P62982;P62986
Appbp2	0	NO	3	3	4.8	7.3E-04	20.8	Amyloid protein-binding protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Appbp2 PE=2 SV=1 - [APBP2_RAT]	ASHK05

**Supplementary Table 3:** p-values for 1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests

1. Tfn-A568 uptake assays (Figure 1E)

Comparison No treatment vs.			Comparison OHT only vs.		
OHT only	****	< 0.0001	No treatment	****	< 0.0001
OHT and dyn2-GFP-WT	ns	>0.9999	OHT and dyn2-GFP-WT	****	< 0.0001
OHT and dyn2-GFP-ΔPRD	****	< 0.0001	OHT and dyn2-GFP-ΔPRD	ns	0.9893
OHT and dyn2-GFP-ΔCter	****	< 0.0001	OHT and dyn2-GFP-ΔCter	ns	0.2156
OHT and dyn2-GFP-ABC <sub>mut</sub>	****	< 0.0001	OHT and dyn2-GFP-ABC <sub>mut</sub>	ns	0.9751
OHT and dyn2-GFP-A <sub>mut</sub>	ns	0.9997	OHT and dyn2-GFP-A <sub>mut</sub>	****	< 0.0001
OHT and dyn2-GFP-B <sub>mut</sub>	****	< 0.0001	OHT and dyn2-GFP-B <sub>mut</sub>	****	< 0.0001
OHT and dyn2-GFP-C <sub>mut</sub>	***	0.0001	OHT and dyn2-GFP-C <sub>mut</sub>	****	< 0.0001
OHT and dyn2-GFP-AC <sub>mut</sub>	****	< 0.0001	OHT and dyn2-GFP-AC <sub>mut</sub>	*	0.0411

2. Dyn2-GFP localisation in TKO cells (Figure 1F)

Comparison dyn2-GFP-WT vs.			Comparison dyn2-GFP-ΔPRD vs.		
dyn2-GFP-ΔPRD	****	< 0.0001	dyn2-GFP-WT	****	< 0.0001
dyn2-GFP-ΔCter	****	< 0.0001	dyn2-GFP-ΔCter	ns	>0.9999
dyn2-GFP-ABC <sub>mut</sub>	****	< 0.0001	dyn2-GFP-ABC <sub>mut</sub>	ns	>0.9999
dyn2-GFP-A <sub>mut</sub>	ns	>0.9999	dyn2-GFP-A <sub>mut</sub>	****	< 0.0001
dyn2-GFP-B <sub>mut</sub>	****	< 0.0001	dyn2-GFP-B <sub>mut</sub>	****	< 0.0001
dyn2-GFP-C <sub>mut</sub>	***	0.0001	dyn2-GFP-C <sub>mut</sub>	****	< 0.0001
dyn2-GFP-AC <sub>mut</sub>	****	< 0.0001	dyn2-GFP-AC <sub>mut</sub>	*	0.0117

3. Effect of peptides on endocytic event frequency (Figure 5D)

Comparison Control WC vs.		
No WC recording	ns	0.5799
GTPγS	**	0.0012
D15 NS 1 mM	ns	>0.9999
D15 0.1 mM	ns	0.9878
D15 1 mM	***	0.0002
D30 0.1 mM	*	0.0338
D44 0.1 mM	*	0.0359
D44 1 mM	****	< 0.0001
dD15-N 0.1 mM	*	0.0476
dD15-N 1 mM	*	0.0132
dD15-C 0.1 mM	*	0.0339
dD15-C 1 mM	****	< 0.0001







# Bibliographie

- Acconcia, F., Sigismund, S., and Polo, S. (2009). Ubiquitin in trafficking: The network at work. *Exp. Cell Res.* *315*, 1610–1618.
- Aidaraliev, N.J., Kamino, K., Kimura, R., Yamamoto, M., Morihara, T., Kazui, H., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Kida, T., et al. (2008). Dynamin 2 gene is a novel susceptibility gene for late-onset Alzheimer disease in non-APOE- $\epsilon$ 4 carriers. *J. Hum. Genet.* *53*, 296–302.
- Anderson, R.G.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* *10*, 351–364.
- Anggono, V., Smillie, K.J., Graham, M.E., Valova, V.A., Cousin, M.A., and Robinson, P.J. (2006). Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis. *Nat. Neurosci.* *9*, 752–760.
- Antonescu, C.N., Aguet, F., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2011). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2588–2600.
- Antonny, B., Burd, C., De Camilli, P., Chen, E., Daumke, O., Faelber, K., Ford, M., Frolov, V.A., Frost, A., Hinshaw, J.E., et al. (2016). Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *EMBO J.* *35*, 2270–2284.
- Ariotti, N., and Parton, R.G. (2013). SnapShot: Caveolae, Caveolins, and Cavins. *Cell* *154*, 704–704.e1.
- Ariotti, N., Fernández-Rojo, M.A., Zhou, Y., Hill, M.M., Rodkey, T.L., Inder, K.L., Tanner, L.B., Wenk, M.R., Hancock, J.F., and Parton, R.G. (2014). Caveolae regulate the nanoscale organization of the plasma membrane to remotely control Ras signaling. *J. Cell Biol.* *204*, 777–792.
- Avinoam, O., Schorb, M., Beese, C.J., Briggs, J.A.G., and Kaksonen, M. (2015). Endocytic sites mature by continuous bending and remodeling of the clathrin coat. *Science* (80- ). *348*, 1369–1372.
- Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W.W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.* *16*, 1055–1069.
- Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., and Drubin, D.G. (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A [published erratum appears in *J Cell Biol* 1999 Sep 6;146(5):following 1201]. *J. Cell Biol.* *137*, 399–416.
- Barak, L.S., and Webb, W.W. (1982). Diffusion of low density lipoprotein-receptor complex on human fibroblasts. *J. Cell Biol.* *95*, 846–852.
- Baschieri, F., Dayot, S., Elkhatib, N., Ly, N., Capmany, A., Schauer, K., Betz, T., Vignjevic, D.M., Poincloux, R., and Montagnac, G. (2018). Frustrated endocytosis controls contractility-independent mechanotransduction at clathrin-coated structures. *Nat. Commun.* *9*.
- Bashkurov, P. V., Akimov, S.A., Evseev, A.I., Schmid, S.L., Zimmerberg, J., and Frolov, V.A. (2008). GTPase Cycle of Dynamin Is Coupled to Membrane Squeeze and Release, Leading to Spontaneous Fission. *Cell* *135*, 1276–1286.
- Behnia, R., and Munro, S. (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* *438*, 597–604.
- Benmerah, A., and Lamaze, C. (2002). Endocytose: Chaque voie compte! *Medecine/Sciences* *18*, 1126–1136.
- Bethoney, K.A., King, M.C., Hinshaw, J.E., Ostap, E.M., and Lemmon, M.A. (2009). A possible effector

- role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 13359–13364.
- Betz, W., and Bewick, G. (1992). Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* (80-. ). *255*, 200–203.
- Bitoun, M., Maugendre, S., Jeannet, P.Y., Lacène, E., Ferrer, X., Laforêt, P., Martin, J.J., Laporte, J., Lochmüller, H., Beggs, A.H., et al. (2005). Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* *37*, 1207–1209.
- Bitoun, M., Bevilacqua, J.A., Eymard, B., Prudhon, B., Fardeau, M., Guicheney, P., and Romero, N.B. (2009). A New Centronuclear Myopathy Phenotype Due To A Novel Dynamin 2 Mutation. *Neurology* 93–95.
- Bitsikas, V., Corrêa, I.R., and Nichols, B.J. (2014). Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *Elife* *3*, e03970.
- Blanpied, T.A., Scott, D.B., and Ehlers, M.D. (2002). Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* *36*, 435–449.
- van der Blik, A.M., and Meyerowitz, E.M. (1991). Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila* shibire gene associated with vesicular traffic. *Lett. to Nat.*
- Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P.D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N.K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., et al. (2004). Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 3833–3838.
- Böcking, T., Aguet, F., Harrison, S.C., and Kirchhausen, T. (2011). Single-molecule analysis of a molecular disassemblase reveals the mechanism of Hsc70-driven clathrin uncoating. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 295–301.
- Boll, W., Ehrlich, M., Collier, R.J., and Kirchhausen, T. (2004). Effects of dynamin inactivation on pathways of anthrax toxin uptake. *Eur J Cell Biol* *83*, 281–288.
- Boucrot, E., Saffarian, S., Massol, R., Kirchhausen, T., and Ehrlich, M. (2006). Role of lipids and actin in the formation of clathrin-coated pits. *Exp. Cell Res.* *312*, 4036–4048.
- Boucrot, E., Saffarian, S., Zhang, R., and Kirchhausen, T. (2010). Roles of AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One* *5*.
- Boucrot, E., Pick, A., Çamdere, G., Liska, N., Evergren, E., McMahon, H.T., and Kozlov, M.M. (2012). Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains. *Cell* *149*, 124–136.
- Boucrot, E., Ferreira, A.P.A., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnnet, N., and McMahon, H.T. (2015). Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* *517*, 460–465.
- Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J.C., Ubelmann, F., and Kirchhausen, T. (2011). Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1124–1132.
- Boumil, R.M., Letts, V.A., Roberts, M.C., Lenz, C., Mahaffey, C.L., Zhang, Z., Moser, T., and Frankel, W.N. (2010). A missense mutation in a highly conserved alternate exon of dynamin-1 causes epilepsy in fitful mice. *PLoS Genet.* *6*.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* (80-. ). *Vol.232*, pp.34-47.
- Bucher, D., Frey, F., Sochacki, K.A., Kummer, S., Bergeest, J.P., Godinez, W.J., Kräusslich, H.G., Rohr, K., Taraska, J.W., Schwarz, U.S., et al. (2018). Clathrin-Adaptor ratio and membrane tension

- regulate the flat-to-curved transition of the clathrin coat during endocytosis. *Nat. Commun.* **9**.
- Camley, B.A., and Brown, F.L.H. (2011). Beyond the creeping viscous flow limit for lipid bilayer membranes: Theory of single-particle microrheology, domain flicker spectroscopy, and long-time tails. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **84**, 1–14.
- Cannon, G., and Swanson, J. (1992). The macrophage capacity for phagocytosis. *J. Cell Sci.* **101**, 907–913.
- Cao, H., Garcia, F., and McNiven, M.A. (1998). Differential Distribution of Dynamin Isoforms in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2595–2609.
- Carpentier, J. -L, Sawano, F., Geiger, D., Gorden, P., Perrelet, A., and Orci, L. (1989). Potassium depletion and hypertonic medium reduce “non-coated” and clathrin-coated pit formation, as well as endocytosis through these two gates. *J. Cell. Physiol.* **138**, 519–526.
- Carr, J.F., and Hinshaw, J.E. (1997). Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and  $\gamma$ -phosphate analogues. *J. Biol. Chem.* **272**, 28030–28035.
- Carroll, S.Y., Stimpson, H.E.M., Weinberg, J., Toret, C.P., Sun, Y., and Drubin, D.G. (2012). Analysis of yeast endocytic site formation and maturation through a regulatory transition point. *Mol. Biol. Cell* **23**, 657–668.
- Chakraborty, J., Rajamma, U., and Mohanakumar, K.P. (2014). A mitochondrial basis for Huntington’s disease: Therapeutic prospects. *Mol. Cell. Biochem.* **389**, 277–291.
- Chappie, J.S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S.L., and Dyda, F. (2010). G domain dimerization controls dynamin’s assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* **465**, 435–440.
- Chappie, J.S., Mears, J.A., Fang, S., Leonard, M., Schmid, S.L., Milligan, R.A., Hinshaw, J.E., and Dyda, F. (2011a). A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell* **147**, 209–222.
- Chappie, J.S., Mears, J.A., Fang, S., Leonard, M., Schmid, S.L., Milligan, R.A., Hinshaw, J.E., and Dyda, F. (2011b). A pseudoatomic model of the dynamin polymer identifies a hydrolysis-dependent powerstroke. *Cell* **147**, 209–222.
- Cheezum, M.K., Walker, W.F., and Guilford, W.H. (2001). Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys. J.* **81**, 2378–2388.
- Chen, M.S., Obar, R.A., Schroeder, C.C., Austin, T.W., Poodry, C.A., Wadsworth, S.C., and Vallee, R.B. (1991). Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature* **351**, 583–586.
- Chen, Y.-J., Zhang, P., Egelman, E.H., and Hinshaw, J.E. (2004). The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **v11**, 574–575.
- Cheng, J.P.X., and Nichols, B.J. (2016). Caveolae: One Function or Many? *Trends Cell Biol.* **26**, 177–189.
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.-C., Waterfield, M.D., Backer, J.M., and Zerial, M. (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat. Cell Biol.* **1**, 249–252.
- Clayton, E.L., and Cousin, M.A. (2009). The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J. Neurochem.* **111**, 901–914.
- Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S., and Kirchhausen, T. (2012). The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell* **150**, 495–507.
- Cocucci, E., Gaudin, R., and Kirchhausen, T. (2014). Dynamin recruitment and membrane scission at the neck of a clathrin-coated pit. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3595–3609.

- Collins, A., Warrington, A., Taylor, K.A., and Svitkina, T. (2011). Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.* *21*, 1167–1175.
- Collins, B.M., McCoy, A.J., Kent, H.M., Evans, P.R., and Owen, D.J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP-2 complex. *Cell* *109*, 523–535.
- Cook, T., Urrutia, R., and McNiven, M.A. (1994). Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 644–648.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Lüthi, A., Kim, W.T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S.B., Flavell, R.A., et al. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* *99*, 179–188.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E., and Schmid, S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* *127*, 915–934.
- Danino, D., Moon, K.H., and Hinshaw, J.E. (2004). Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. *J. Struct. Biol.* *147*, 259–267.
- Dar, S., and Pucadyil, T.J. (2017). The pleckstrin-homology domain of dynamin is dispensable for membrane constriction and fission. *Mol. Biol. Cell* *28*, 152–160.
- Dar, S., Kamerkar, S.C., and Pucadyil, T.J. (2015a). A high-throughput platform for real-time analysis of membrane fission reactions reveals dynamin function. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1588–1596.
- Dar, S., Kamerkar, S.C., and Pucadyil, T.J. (2015b). A high-throughput platform for real-time analysis of membrane fission reactions reveals dynamin function. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1588–1596.
- Das, S., Yin, T., Yang, Q., Zhang, J., Wu, Y.I., and Yu, J. (2015). Single-molecule tracking of small GTPase Rac1 uncovers spatial regulation of membrane translocation and mechanism for polarized signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, E267–E276.
- Dautry-Varsat, A., Ciechanover, A., and Lodish, harvey F. (1983). pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *80*, 2258–2262.
- Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 870–879.
- Diakonova, M., Bokoch, G., and Swanson, J.A. (2002). Dynamics of Cytoskeletal Proteins during Fcγ Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages. *Mol. Biol. Cell* *13*, 402–411.
- Dittman, J., and Ryan, T.A. (2009). Molecular Circuitry of Endocytosis at Nerve Terminals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *25*, 133–160.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 857–902.
- Doyon, J.B., Zeitler, B., Cheng, J., Cheng, A.T., Cherone, J.M., Santiago, Y., Lee, A.H., Vo, T.D., Doyon, Y., Miller, J.C., et al. (2011). Rapid and efficient clathrin-mediated endocytosis revealed in genome-edited mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* *13*, 331–337.
- Durieux, A.C., Prudhon, B., Guicheney, P., and Bitoun, M. (2010). Dynamin 2 and human diseases. *J. Mol. Med.* *88*, 339–350.
- Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M.L., and Kirchhausen, T. (2004). Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* *118*, 591–605.
- Elkhatib, N., Bresteau, E., Baschieri, F., Rioja, A.L., Van Niel, G., Vassilopoulos, S., and Montagnac, G. (2017). Tubular clathrin/AP-2 lattices pinch collagen fibers to support 3D cell migration. *Science* (80-. ). 356.
- Eschenburg, S., and Reubold, T.F. (2018). Modulation of dynamin function by small molecules. *Biol.*

Chem. 399, 1421–1432.

- Ewers, H., Römer, W., Smith, A.E., Bacia, K., Dmitrieff, S., Chai, W., Mancini, R., Kartenbeck, J., Chambon, V., Berland, L., et al. (2010). GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nat. Cell Biol.* 12, 11–18.
- Ezratty, E.J., Bertaux, C., Marcantonio, E.E., and Gundersen, G.G. (2009). Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J. Cell Biol.* 187, 733–747.
- Faelber, K., Posor, Y., Gao, S., Held, M., Roske, Y., Schulze, D., Haucke, V., Noé, F., and Daumke, O. (2011). Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature* 477, 556–562.
- Faelber, K., Held, M., Gao, S., Posor, Y., Haucke, V., Noé, F., and Daumke, O. (2012). Structural insights into dynamin-mediated membrane fission. *Structure* 20, 1621–1628.
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S.R., Rose, K., and De Camilli, P. (2001). Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell Biol.* 155, 193–200.
- Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 75–88.
- Ferguson, K.M., Lemmon, M.A., Schlessinger, J., and Sigler, P.B. (1994). Crystal structure at 2.2 Å resolution of the pleckstrin homology domain from human dynamin. *Cell* 79, 199–209.
- Ferguson, S., Raimondi, A., Paradise, S., Shen, H., Mesaki, K., Ferguson, A., Destaing, O., Ko, G., Takasaki, J., Cremona, O., et al. (2009). Coordinated Actions of Actin and BAR Proteins Upstream of Dynamin at Endocytic Clathrin-Coated Pits. *Dev. Cell* 17, 811–822.
- Ferguson, S.M., Brasnjo, G., Hayashi, M., Wölfel, M., Collesi, C., Giovedi, S., Raimondi, A., Gong, L.W., Ariel, P., Paradise, S., et al. (2007). A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science* (80-. ). 316, 570–574.
- Ford, M.G., Pearse, B.M., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291, 1051–1055.
- Ford, M.G.J., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J.K., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419, 361–366.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S.C., Kirchhausen, T., and Walz, T. (2004). Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 432, 573–579.
- French, A., Tadaki, D., Niyogi, S., and Lauffenburger, D. (1995). Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly. 4334–4340.
- Frost, A., Perera, R., Roux, A., Spasov, K., Destaing, O., Egelman, E.H., De Camilli, P., and Unger, V.M. (2008). Structural Basis of Membrane Invagination by F-BAR Domains. *Cell* 132, 807–817.
- Fujimoto, L.M., Roth, R., Heuser, J.E., and Schmid, S.L. (2000). Actin Assembly Plays a Variable , but not Obligatory Role in Receptor-Mediated Endocytosis in Mammalian. 161–171.
- Fukuda, M., Kanno, E., Ishibashi, K., and Itoh, T. (2008). Large Scale Screening for Novel Rab Effectors Reveals Unexpected Broad Rab Binding Specificity. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 1031–1042.
- Gad, H., Ringstad, N., Löw, P., Kjaerulff, O., Gustafsson, J., Wenk, M., Di Paolo, G., Nemoto, Y., Crum, J., Ellisman, M.H., et al. (2000). Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* 27, 301–312.
- Gao, S., Von Der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G., and Daumke, O. (2010). Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* 465, 502–

- Gervasio, O.L., Phillips, W.D., Cole, L., and Allen, D.G. (2011). Caveolae respond to cell stretch and contribute to stretch-induced signaling. *J. Cell Sci.* *124*, 3581–3590.
- Gold, E.S., Underhill, D.M., Morrissette, N.S., Guo, J., McNiven, M.A., and Aderem, A. (1999). Dynamin 2 Is Required for Phagocytosis in Macrophages. *J. Exp. Med.* *190*, 1849–1856.
- Gottlieb, T., Ivanov, I., Adesnik, M., and Sabatini, D. (1993). Actin Microfilaments Play a Critical Role in Endocytosis at the Apical but not the Basolateral Surface of Polarized Epithelial Cells. *120*, 695–710.
- Gould, G.W., and Lippincott-schwartz, J. (2009). New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *10*, 287–292.
- Grabs, D., Slepnev, V.I., Songyang, Z., David, C., Lynch, M., Cantley, L.C., and De Camilli, P. (1997). The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J. Biol. Chem.* *272*, 13419–13425.
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S.J., and Lagnado, L. (2006). Clathrin-mediated endocytosis: The physiological mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *J. Physiol.* *773*–786.
- Grassart, A., Cheng, A.T., Hong, S.H., Zhang, F., Zenzer, N., Feng, Y., Briner, D.M., Davis, G.D., Malkov, D., and Drubin, D.G. (2014). Actin and dynamin2 dynamics and interplay during clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* *205*, 721–735.
- Gray, E.G., and Willis, R.A. (1970). On synaptic vesicles, complex vesicles and dense projections. *Brain Res.* *24*, 149–168.
- Gruenberg, J. (1993). Mecanismes De La Regulation Du Trafic Membranaire. *Medecine/Sciences* *9*, 141–147.
- ter Haar, E., Harrison, S.C., and Kirchhausen, T. (2000). Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta -propeller of clathrin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 1096–1100.
- Hansen, C.G., and Nichols, B.J. (2010). Exploring the caves: Cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.* *20*, 177–186.
- Hansen, C.G., Howard, G., and Nichols, B.J. (2011). Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *J. Cell Sci.* *124*, 2777–2785.
- Hansen, C.G., Shvets, E., Howard, G., Riento, K., and Nichols, B.J. (2013). Deletion of cavin genes reveals tissue-specific mechanisms for morphogenesis of endothelial caveolae. *Nat. Commun.* *4*, 1813–1831.
- Harjes, P., and Wanker, E.E. (2003). The hunt for huntingtin function: Interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 425–433.
- Harlan, J.E., Hajduk, P.J., Yoon, H.S., and Fesik, S.W. (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* *371*, 168–170.
- Harper, C.B., Popoff, M.R., McCluskey, A., Robinson, P.J., and Meunier, F.A. (2013). Targeting membrane trafficking in infection prophylaxis: Dynamin inhibitors. *Trends Cell Biol.* *23*, 90–101.
- Harrison, R.E., and Grinstein, S. (2002). Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton. *Biochem. Cell Biol.* *80*, 509–515.
- Haucke, V., and Kozlov, M.M. (2018). Membrane remodeling in clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Sci.* *131*, jcs216812.
- Haucke, V., Neher, E., and Sigrist, S.J. (2011). Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis

and endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 127–138.

- Henne, W.M., Kent, H.M., Ford, M.G.J., Hegde, B.G., Daumke, O., Butler, P.J.G., Mittal, R., Langen, R., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2007). Structure and Analysis of FCHO2 F-BAR Domain: A Dimerizing and Membrane Recruitment Module that Effects Membrane Curvature. *Structure* *15*, 839–852.
- Henne, W.M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergreen, E., Vallis, Y., Mittal, R., McMahon, H.T., and Evergreen, E. (2010). FCHO Proteins Are Nucleators of. *Science* (80-. ). *328*, 1281–1284.
- Henriques, R., Lelek, M., Fornasiero, E.F., Valtorta, F., Zimmer, C., and Mhlanga, M.M. (2010). QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. *Nat. Methods* *7*, 339–340.
- Henriques, R., Griffiths, C., Rego, E.H., and Mhlanga, M.M. (2011). PALM and STORM: Unlocking live-cell super-resolution. *Biopolymers* *95*, 322–331.
- Henry, A.G., Hislop, J.N., Grove, J., Thorn, K., Marsh, M., and von Zastrow, M. (2012). Regulation of Endocytic Clathrin Dynamics by Cargo Ubiquitination. *Dev. Cell* *23*, 519–532.
- Heuser, J. (1980). Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J. Cell Biol.* *84*, 560–583.
- Heuser, E., and Reese, T.S. (1973). Evidence for Recycling of Synaptic Vesicle Membrane During Transmitter Release At the Frog Neuromuscular Junction. *J. Cell Biol.* *57*, 15–344.
- Heymann, J.A.W., and Hinshaw, J.E. (2009). Dynamins at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 3427–3431.
- Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V.M.J., Martin, S., et al. (2008). PTRF-Cavin, a Conserved Cytoplasmic Protein Required for Caveola Formation and Function. *Cell* *132*, 113–124.
- Hill, T.A., Gordon, C.P., McGeachie, A.B., Venn-Brown, B., Odell, L.R., Chau, N., Quan, A., Mariana, A., Sakoff, J.A., Chircop, M., et al. (2009). Inhibition of dynamin mediated endocytosis by the Dynoles - Synthesis and functional activity of a family of indoles. *J. Med. Chem.* *52*, 3762–3773.
- Hines, J.H., Abu-Rub, M., and Henley, J.R. (2010). Asymmetric endocytosis and remodeling of B1-integrin adhesions during growth cone chemorepulsion by MAG. *Nat. Neurosci.* *13*, 829–837.
- Hinshaw, J.E. (2000). Dynamin and Its Role in Membrane Fission. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* *16*, 483–519.
- Hinshaw, J.E., and Schmid, S.L. (1995). Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* *374*, 190–192.
- Hohendahl, A., Talledge, N., Galli, V., Shen, P.S., Humbert, F., de Camilli, P., Frost, A., and Roux, A. (2017). Structural inhibition of dynamin-mediated membrane fission by endophilin. *Elife* *6*, 1–19.
- Höning, S., Ricotta, D., Krauss, M., Späte, K., Spolaore, B., Motley, A., Robinson, M., Robinson, C., Haucke, V., and Owen, D.J. (2005). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Mol. Cell* *18*, 519–531.
- Hooke, R. (1665). *Micrographia, or, Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses :with observations and inquiries thereupon /by R. Hooke ...*
- Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 751–780.
- Horton, A.C., and Ehlers, M.D. (2003). Review Neuronal Polarity and Trafficking How are membrane constituents trafficked through such The establishment of subcellular domains with distinct

2 Department of Cell Biology molecular components and functional properties is a fun. *Neuron* **40**, 277–295.

- Howes, M.T., Kirkham, M., Riches, J., Cortese, K., Walser, P.J., Simpson, F., Hill, M.M., Jones, A., Lundmark, R., Lindsay, M.R., et al. (2010). Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Biol.* **190**, 675–691.
- Hu, J., Shibata, Y., Zhu, P.P., Voss, C., Rismanchi, N., Prinz, W.A., Rapoport, T.A., and Blackstone, C. (2009). A Class of Dynamin-like GTPases Involved in the Generation of the Tubular ER Network. *Cell* **138**, 549–561.
- Inokawa, Y., Nomoto, S., Hishida, M., Hayashi, M., Kanda, M., Nishikawa, Y., Takeda, S., Fujiwara, M., Koike, M., Sugimoto, H., et al. (2013). Dynamin 3: A new candidate tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma detected by triple combination array analysis. *Onco. Targets. Ther.* **6**, 1417–1424.
- Ishida, N., Nakamura, Y., Tanabe, K., Li, S.-A., and Takei, K. (2011). Dynamin 2 Associates with Microtubules at Mitosis and Regulates Cell Cycle Progression. *Cell Struct. Funct.* **36**, 145–154.
- Ishihara, N. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* **117**, 6535–6546.
- Ishikawa-Ankerhold, H.C., Ankerhold, R., and Drummen, G.P.C. (2012). Advanced fluorescence microscopy techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* **17**, 4047–4132.
- Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev. Cell* **9**, 791–804.
- Izeddin, I., Boulanger, J., Racine, V., Specht, C.G., Kechkar, A., Nair, D., Triller, A., Choquet, D., Dahan, M., and Sibarita, J.B. (2012). Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt. Express* **20**, 2081.
- Jackson, L.P., Kelly, B.T., McCoy, A.J., Gaffry, T., James, L.C., Collins, B.M., Höning, S., Evans, P.R., and Owen, D.J. (2010). A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP-2 clathrin adaptor complex. *Cell* **141**, 1220–1229.
- Janzen, C., Kochs, G., and Haller, O. (2000). A monomeric GTPase-negative MxA mutant with antiviral activity. *J. Virol.* **74**, 8202–8206.
- Jeff, G., Schnapp, B.J., and Sheetz, M.P. (1988). © 198 8 Nature Publishing Group. *Nature* **331**, 450.
- Jockusch, W.J., Praefcke, G.J.K., McMahon, H.T., and Lagnado, L. (2005). Clathrin-dependent and clathrin-independent retrieval of synaptic vesicles in retinal bipolar cells. *Neuron* **46**, 869–878.
- Jones, A.T. (2007). Macropinocytosis: Searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 670–684.
- Kadlecova, Z., Spielman, S.J., Loerke, D., Mohanakrishnan, A., Reed, D.K., and Schmid, S.L. (2017). Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP-2. *J. Cell Biol.* **216**, 167–179.
- Kaksonen, M., and Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 313–326.
- Kamiguchi, H., and Lemmon, V. (2000). IgCAMs: Bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 598–605.
- Kanaseki, T., and 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. 202–220.

- Kar, U.P., Dey, H., and Rahaman, A. (2017). Regulation of dynamin family proteins by post-translational modifications. *J. Biosci.* *42*, 333–344.
- Kelly, B.T., McCoy, A.J., Späte, K., Miller, S.E., Evans, P.R., Höning, S., and Owen, D.J. (2008). A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP-2 complex. *Nature* *456*, 976–979.
- Kelly, B.T., Graham, S.C., Liska, N., Dannhauser, P.N., Höning, S., Ungewickell, E.J., and Owen, D.J. (2014). AP-2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science* (80-). *345*, 459–463.
- Kim, Y.T., and Wu, C.F. (1987). Reversible blockage of neurite development and growth cone formation in neuronal cultures of a temperature-sensitive mutant of *Drosophila*. *J. Neurosci.* *7*, 3245–3255.
- Kirchhausen, T., and Harrison, S.C. (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell* *23*, 755–761.
- Kirchhausen, T., Bonifacino, J.S., and Riezman, H. (1997). Linking cargo to vesicle formation: Receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 488–495.
- Kirkham, M., Fujita, A., Chadda, R., Nixon, S.J., Kurzchalia, T. V., Sharma, D.K., Pagano, R.E., Hancock, J.F., Mayor, S., and Parton, R.G. (2005). Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J. Cell Biol.* *168*, 465–476.
- Klein, D.E., Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S., and Lemmon, M.A. (1998). The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *J. Biol. Chem.* *273*, 27725–27733.
- Koenig, J.H., and Ikeda, K. (1989). Disappearance and Reformation of Synaptic Vesicle Membrane Upon Transmitter Release Observed Under Reversible Blockage of Membrane Retrieval. *J. Neurosci.* *9*, 3844–3860.
- Koenig, J.H., Kosaka, T., and Ikeda, K. (1989). The relationship between the number of synaptic vesicles and the amount of transmitter released. *J. Neurosci.* *9*, 1937–1942.
- Kong, L., Sochacki, K.A., Wang, H., Fang, S., Canagarajah, B., Kehr, A.D., Rice, W.J., Strub, M.P., Taraska, J.W., and Hinshaw, J.E. (2018). Cryo-EM of the dynamin polymer assembled on lipid membrane. *Nature* *560*, 258–262.
- Kononenko, N.L., and Haucke, V. (2015). Molecular mechanisms of presynaptic membrane retrieval and synaptic vesicle reformation. *Neuron* *85*, 484–496.
- Kononenko, N.L., Puchkov, D., Classen, G.A., Walter, A.M., Pechstein, A., Sawade, L., Kaempfer, N., Trimbuch, T., Lorenz, D., Rosenmund, C., et al. (2014). Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron* *82*, 981–988.
- Koutsopoulos, O.S., Koch, C., Tosch, V., Böhm, J., North, K.N., and Laporte, J. (2011). Mild functional differences of dynamin 2 mutations associated to centronuclear myopathy and charcot-marie-tooth peripheral neuropathy. *PLoS One* *6*.
- Kovtun, O., Tillu, V.A., Jung, W.R., Leneva, N., Ariotti, N., Chaudhary, N., Mandyam, R.A., Ferguson, C., Morgan, G.P., Johnston, W.A., et al. (2014). Structural insights into the organization of the cavin membrane coat complex. *Dev. Cell* *31*, 405–419.
- Kovtun, O., Tillu, V.A., Ariotti, N., Parton, R.G., and Collins, B.M. (2015). Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *J. Cell Sci.* *128*, 1269–1278.
- Kubalek, E., Le Grice, S., and Brown, P. (1994). Two-Dimensional Crystallization of Histidine-Tagged,

HIV-1 Reverse Transcriptase Promoted by a Novel Nickel-Chelating Lipid. 117–123.

- Kukulski, W., Schorb, M., Kaksonen, M., and Briggs, J.A.G. (2012). Plasma membrane reshaping during endocytosis is revealed by time-resolved electron tomography. *Cell* *150*, 508–520.
- Kural, C., Tacheva-Grigorova, S.K., Boulant, S., Cocucci, E., Baust, T., Duarte, D., and Kirchhausen, T. (2012a). Dynamics of Intracellular Clathrin/AP1- and Clathrin/AP3-Containing Carriers. *Cell Rep.* *2*, 1111–1119.
- Kural, C., Tacheva-Grigorova, S.K., Boulant, S., Cocucci, E., Baust, T., Duarte, D., and Kirchhausen, T. (2012b). Dynamics of Intracellular Clathrin/AP1- and Clathrin/AP3-Containing Carriers. *Cell Rep.* *2*, 1111–1119.
- Kuravi, K. (2006). Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* *119*, 3994–4001.
- Kuwano, R., Miyashita, A., Arai, H., Asada, T., Imagawa, M., Shoji, M., Higuchi, S., Urakami, K., Kakita, A., Takahashi, H., et al. (2006). Dynamin-binding protein gene on chromosome 10q is associated with late-onset Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 2170–2182.
- Lai, M.M., Hong, J.J., Ruggiero, A.M., Burnett, P.E., Slepnev, V.I., Camilli, P. De, and Snyder, S.H. (1999). Complex as a Calcium Sensor for Synaptic Vesicle Endocytosis. *J. Biol. Chem.* *274*, 25963–25967.
- Lakshminarayan, R., Wunder, C., Becken, U., Howes, M.T., Benzing, C., Arumugam, S., Sales, S., Ariotti, N., Chambon, V., Lamaze, C., et al. (2014). Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers. *Nat. Cell Biol.* *16*, 592–603.
- Lamaze, C., Fujimoto, L.M., Yin, H.L., and Schmid, S.L. (1997). The Actin Cytoskeleton Is Required for Receptor-mediated. *J. Biol. Chem.* *272*, 20332–20335.
- Lampe, M., Pierre, F., Al-Sabah, S., Krasel, C., and Merrifield, C.J. (2014a). Dual single-scission event analysis of constitutive transferrin receptor (TfR) endocytosis and ligand-triggered 2-adrenergic receptor (2AR) or Mu-opioid receptor (MOR) endocytosis. *Mol. Biol. Cell* *25*, 3070–3080.
- Lampe, M., Pierre, F., Al-Sabah, S., Krasel, C., and Merrifield, C.J. (2014b). Dual single-scission event analysis of constitutive transferrin receptor (TfR) endocytosis and ligand-triggered 2-adrenergic receptor (2AR) or Mu-opioid receptor (MOR) endocytosis. *Mol. Biol. Cell* *25*, 3070–3080.
- Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S., and Lemmon, M.A. (1999). Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr. Biol.* *9*, 261–264.
- Lee, J.E., Westrate, L.M., Wu, H., Page, C., and Voeltz, G.K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* *540*, 139–143.
- Lee, S., Jung, K.Y., Park, J., Cho, J.H., Kim, Y.C., and Chang, S. (2010). Synthesis of potent chemical inhibitors of dynamin GTPase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* *20*, 4858–4864.
- Lenz, M., Prost, J., and Joanny, J.F. (2008). Mechanochemical action of the dynamin protein. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* *78*, 1–16.
- Li, D., and Betzig, E. (2015). Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science* (80-. ). *349*.
- Li, H., Alavian, K.N., Lazrove, E., Mehta, N., Jones, A., Zhang, P., Licznerski, P., Graham, M., Uo, T., Guo, J., et al. (2013). A Bcl-x L-Drp1 complex regulates synaptic vesicle membrane dynamics during endocytosis. *Nat. Cell Biol.* *15*, 773–785.

- Li, Y.Y., Chen, X.N., Fan, X.X., Zhang, Y.J., Gu, J., Fu, X.W., Wang, Z.H., Wang, X.F., and Xiao, Z. (2015). Upregulated dynamin 1 in an acute seizure model and in epileptic patients. *Synapse* 69, 67–77.
- Liebman P A, and Entine G (1974). Lateral Diffusion of Visual Pigment in Photoreceptor Disk Membranes. *Science* (80- ). 185, 457–459.
- Liss, P.S., and Slater, P.G. (1974). © 1974 Nature Publishing Group. Group.
- Liu, J., Sun, Y., Drubin, D.G., and Oster, G.F. (2009). The mechanochemistry of endocytosis. *PLoS Biol.* 7.
- Liu, Y.-W., Neumann, S., Ramachandran, R., Ferguson, S.M., Pucadyil, T.J., and Schmid, S.L. (2011). Differential curvature sensing and generating activities of dynamin isoforms provide opportunities for tissue-specific regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, E234–E242.
- Liu, Y.W., Mattila, J.P., and Schmid, S.L. (2013). Dynamin-Catalyzed Membrane Fission Requires Coordinated GTP Hydrolysis. *PLoS One* 8.
- Llobet, A., Gallop, J.L., Burden, J.J.E., Camdere, G., Chandra, P., Vallis, Y., Hopkins, C.R., Lagnado, L., and McMahon, H.T. (2011). Endophilin Drives the Fast Mode of Vesicle Retrieval in a Ribbon Synapse. *J. Neurosci.* 31, 8512–8519.
- Loerke, D., Wienisch, M., Kochubey, O., and Klingauf, J. (2005). Differential control of clathrin subunit dynamics measured with EW-FRAP microscopy. *Traffic* 6, 918–929.
- Loerke, D., Mettlen, M., Yarar, D., Jaqaman, K., Jaqaman, H., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2009). Cargo and Dynamin Regulate Clathrin-Coated Pit Maturation. *PLoS Biol.* 7.
- De Los Santos, C., Chang, C.W., Mycek, M.A., and Cardullo, R.A. (2015). FRAP, FLIM, and FRET: Detection and analysis of cellular dynamics on a molecular scale using fluorescence microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 82, 587–604.
- Lou, X., Fan, F., Messa, M., Raimondi, A., Wu, Y., Looger, L.L., Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2012). Reduced release probability prevents vesicle depletion and transmission failure at dynamin mutant synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E515–E523.
- Ludwig, A., Howard, G., Mendoza-Topaz, C., Deerinck, T., Mackey, M., Sandin, S., Ellisman, M.H., and Nichols, B.J. (2013). Molecular Composition and Ultrastructure of the Caveolar Coat Complex. *PLoS Biol.* 11.
- Lundmark, R., and Carlsson, S.R. (2004). Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9. *J. Biol. Chem.* 279, 42694–42702.
- Lüscher, C., Xia, H., Beattie, E.C., Carroll, R.C., von Zastrow, M., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1999). Role of AMPA Receptor Cycling in Synaptic Transmission and Plasticity. *Neuron* 24, 649–658.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. *Dev. Cell* 10, 839–850.
- Manley, S., Gillette, J.M., Patterson, G.H., Shroff, H., Hess, H.F., Betzig, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat. Methods* 5, 155–157.
- Marks, B., Stowell, M.H.B., Vallis, Y., Mills, I.G., Gibson, A., Hopkins, C.R., and McMahon, H.T. (2001). GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 410, 231–235.
- Marsh, M., and McMahon, H.T. (1999). The structural era of endocytosis [In Process Citation]. *Science* (80- ). 285, 215–220.
- Massol, R.H., Boll, W., Griffin, A.M., and Kirchhausen, T. (2006). A burst of auxilin recruitment

- determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 10265–10270.
- De Matteis, M.A., and Luini, A. (2011). Mendelian Disorders of Membrane Trafficking. *N. Engl. J. Med.* *365*, 927–938.
- Mattila, J.P., Shnyrova, A. V., Sundborger, A.C., Hortelano, E.R., Fuhrmans, M., Neumann, S., Müller, M., Hinshaw, J.E., Schmid, S.L., and Frolov, V.A. (2015). A hemi-fission intermediate links two mechanistically distinct stages of membrane fission. *Nature* *524*, 109–113.
- May, R.C., and Machesky, L.M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.*
- Mayor, S., and Pagano, R.E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 603–612.
- Mccluskey, A., Daniel, J.A., Hadzic, G., Chau, N., Clayton, E.L., Mariana, A., Whiting, A., Gorgani, N.N., Lloyd, J., Quan, A., et al. (2013). Building a better dynasore: The dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic* *14*, 1272–1289.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 517–533.
- McMahon, H.T., and Gallop, J.L. (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* *438*, 590–596.
- Mears, J.A., Ray, P., and Hinshaw, J.E. (2007). A Corkscrew Model for Dynamin Constriction. *Structure* *15*, 1190–1202.
- Meinecke, M., Boucrot, E., Camdere, G., Hon, W.C., Mittal, R., and McMahon, H.T. (2013). Cooperative recruitment of dynamin and BIN/Amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *J. Biol. Chem.* *288*, 6651–6661.
- Meister, M., Zuk, A., and Tikkanen, R. (2014). Role of dynamin and clathrin in the cellular trafficking of flotillins. *FEBS J.* *281*, 2956–2976.
- Meng, J. (2017). Distinct functions of dynamin isoforms in tumorigenesis and their potential as therapeutic targets in cancer. *Oncotarget* *8*, 41701–41716.
- Mercer, J., and Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* *11*, 510–520.
- Merrifield, C.J., Feldman, M.E., Wan, L., and Almers, W. (2002). Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat. Cell Biol.* *4*, 691–698.
- Merrifield, C.J., Perrais, D., and Zenisek, D. (2005). Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell* *121*, 593–606.
- Mettlen, M., Stoeber, M., Loerke, D., Antonescu, C., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2009). Endocytic Accessory Proteins Are Functionally Distinguished by Their Differential Effects on the Maturation of Clathrin-coated Pits. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3251–3260.
- Mettlen, M., Loerke, D., Yarar, D., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2010). Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* *188*, 919–933.
- Miller, S.E., Mathiasen, S., Bright, N.A., Pierre, F., Kelly, B.T., Kladt, N., Schauss, A., Merrifield, C.J., Stamou, D., Höning, S., et al. (2015). CALM Regulates Clathrin-Coated Vesicle Size and Maturation by Directly Sensing and Driving Membrane Curvature. *Dev. Cell* *33*, 163–175.
- Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V., and Melikyan, G.B. (2009). HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. *Cell* *137*, 433–444.
- Mohanakrishnan, A., Tran, T.V.M., Kumar, M., Chen, H., Posner, B.A., and Schmid, S.L. (2017). A highly-sensitive high throughput assay for dynamin's basal GTPase activity. *PLoS One* *12*, e0185639.

- Moren, B., Shah, C., Howes, M.T., Schieber, N.L., McMahon, H.T., Parton, R.G., Daumke, O., and Lundmark, R. (2012). EHD2 regulates caveolar dynamics via ATP-driven targeting and oligomerization. *Mol. Biol. Cell* *23*, 1316–1329.
- Morlot, S., Lenz, M., Prost, J., Joanny, J.F., and Roux, A. (2010). Deformation of dynamin helices damped by membrane friction. *Biophys. J.* *99*, 3580–3588.
- Morlot, S., Galli, V., Klein, M., Chiaruttini, N., Manzi, J., Humbert, F., Dinis, L., Lenz, M., Cappello, G., and Roux, A. (2012). Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell* *151*, 619–629.
- Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N.J., and Robinson, M.S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* *162*, 909–918.
- Nadiminti, S.S.P., Kamak, M., and Koushika, S.P. (2018). Tied up: Does altering phosphoinositide-mediated membrane trafficking influence neurodegenerative disease phenotypes? *J. Genet.* *97*, 753–771.
- Nair, D., Hosy, E., Petersen, J.D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., and Sibarita, J.-B. (2013). Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. *J. Neurosci.* *33*, 13204–13224.
- Nakata, T., Iwamoto, A., Noda, Y., Takemura, R., Yoshikura, H., and Hirokawa, N. (1991). Predominant and developmentally regulated expression of dynamin in neurons. *Neuron* *7*, 461–469.
- Nankoe, S.R., and Sever, S. (2006). Dynasore puts a new spin on dynamin: a surprising dual role during vesicle formation. *Trends Cell Biol.* *16*, 607–609.
- Neher, E., and Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *79*, 6712–6716.
- Neumann, S., and Schmid, S.L. (2013). Dual role of BAR domain-containing proteins in regulating vesicle release catalyzed by the GTPase, dynamin-2. *J. Biol. Chem.* *288*, 25119–25128.
- Newton, A.J., Kirchhausen, T., and Murthy, V.N. (2006). Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 17955–17960.
- Nunez, D., Antonescu, C., Mettlen, M., Liu, A., Schmid, S.L., Loerke, D., and Danuser, G. (2011). Hotspots Organize Clathrin-Mediated Endocytosis by Efficient Recruitment and Retention of Nucleating Resources. *Traffic* *12*, 1868–1878.
- Nüsse, O. (2011). Biochemistry of the phagosome: The challenge to study a transient organelle. *ScientificWorldJournal.* *11*, 2364–2381.
- Of, D., Marker, F., Probe, A.S.A., and Mobility, O.F. (1976). DYNAMICS OF FLUORESCENCE MARKER Diffus2on. *16*, 1315–1329.
- Okamoto, K., and Shaw, J.M. (2005). Mitochondrial Morphology and Dynamics in Yeast and Multicellular Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* *39*, 503–536.
- Opazo, P., Sainlos, M., and Choquet, D. (2012). Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Curr. Opin. Neurobiol.* *22*, 453–460.
- Orso, G., Pendin, D., Liu, S., Tosetto, J., Moss, T.J., Faust, J.E., Micaroni, M., Egorova, A., Martinuzzi, A., McNew, J.A., et al. (2009). Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase Atlastin. *Nature* *460*, 978–983.
- Owen, D.J. (2000). The structure and function of the beta2-adaptin appendage domain. *EMBO J.* *19*, 4216–4227.
- Owen, D.M., Williamson, D., Magenau, A., and Gaus, K. (2012). Optical techniques for imaging

membrane domains in live cells (live-cell palm of protein clustering) (Elsevier Inc.).

- Palade, G.E., and Bruns, R.R. (1968). Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J. Cell Biol.* *37*, 633–649.
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* *443*, 651–657.
- Park, R.J., Shen, H., Liu, L., Liu, X., Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2013). Dynamin triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamin inhibitors. *J. Cell Sci.* *126*, 5305–5312.
- Parton, R.G., and Del Pozo, M.A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 98–112.
- Parton, R.G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 185–194.
- Pearse, B.M.F. (1975). Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* *97*, 93–98.
- Perrais, D., and Merrifield, C.J. (2005). Dynamics of endocytic vesicle creation. *Dev. Cell* *9*, 581–592.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mius, I.G., Butler, P.J.G., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2004). BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature. *Science* (80- ). *303*, 495–500.
- Picco, A., Mund, M., Ries, J., Nédélec, F., and Kaksonen, M. (2015). Visualizing the functional architecture of the endocytic machinery. *Elife* *2015*, 1–29.
- Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L., Ferreira, T., Gautier, R., Goud, B., Antony, B., and Barelli, H. (2014). Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science* (80- ). *345*, 693–697.
- Praefcke, G.J.K., and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: Universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 133–147.
- Praefcke, G.J.K., Ford, M.G.J., Schmid, E.M., Olesen, L.E., Gallop, J.L., Peak-Chew, S.Y., Vallis, Y., Babu, M.M., Mills, I.G., and McMahon, H.T. (2004). Evolving nature of the AP-2  $\alpha$ -appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis. *EMBO J.* *23*, 4371–4383.
- Preta, G., Cronin, J.G., and Sheldon, I.M. (2015). Dynasore - not just a dynamin inhibitor. *Cell Commun. Signal.* *13*, 24.
- Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G., and Hancock, J.F. (2003). Direct visualization of ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.* *160*, 165–170.
- Pucadyil, T.J., and Schmid, S.L. (2008). Real-Time Visualization of Dynamin-Catalyzed Membrane Fission and Vesicle Release. *Cell* *135*, 1263–1275.
- Puthenveedu, M.A., and von Zastrow, M. (2006). Cargo Regulates Clathrin-Coated Pit Dynamics. *Cell* *127*, 113–124.
- Qualmann, B., Koch, D., and Kessels, M.M. (2011). Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO J.* *30*, 3501–3515.
- Quan, A., McGeachie, A.B., Keating, D.J., van Dam, E.M., Rusak, J., Chau, N., Malladi, C.S., Chen, C., McCluskey, A., Cousin, M.A., et al. (2007). Myristyl Trimethyl Ammonium Bromide and Octadecyl Trimethyl Ammonium Bromide Are Surface-Active Small Molecule Dynamin Inhibitors that Block Endocytosis Mediated by Dynamin I or Dynamin II. *Mol. Pharmacol.* *72*, 1425–1439.
- Racine, V., Hertzog, A., Jouanneau, J., Salamero, J., Kervrann, C., and Sibarita, J.-B. (2006). Multiple-

- target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing. 3rd IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging Nano to Macro, 2006 1020–1023.
- Rahaman, A., Elde, N.C., and Turkewitz, A.P. (2008). A Dynamin-Related Protein Required for Nuclear Remodeling in Tetrahymena. *Curr. Biol.* *18*, 1227–1233.
- Raimondi, A., Ferguson, S.M., Lou, X., Armbruster, M., Paradise, S., Giovedi, S., Messa, M., Kono, N., Takasaki, J., Cappello, V., et al. (2011). Overlapping Role of Dynamin Isoforms in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neuron* *70*, 1100–1114.
- Ramachandran, R. (2011). Vesicle scission: Dynamin. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 10–17.
- Ramachandran, R., and Schmid, S.L. (2008). Real-time detection reveals that effectors couple dynamin's GTP-dependent conformational changes to the membrane. *EMBO J.* *27*, 27–37.
- Ramachandran, R., Surka, M., Chappie, J.S., Fowler, D.M., Foss, T.R., Song, B.D., and Schmid, S.L. (2007). The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *EMBO J.* *26*, 559–566.
- Ramachandran, R., Pucadyil, T.J., Liu, Y.W., Acharya, S., Leonard, M., Lukiyanchuk, V., and Schmid, S.L. (2009). Membrane Insertion of the Pleckstrin Homology Domain Variable Loop 1 Is Critical for Dynamin-catalyzed Vesicle Scission. *Mol. Biol. Cell* *20*, 4630–4639.
- Ramjaun, A.R., and McPherson, P.S. (1998). Multiple Amphiphysin II Splice Variants Display Differential Clathrin Binding : Identification of Two Distinct. *J. Neurochem.*
- Rao, Y., Ma, Q., Vahedi-Faridi, A., Sundborger, A., Pechstein, A., Puchkov, D., Luo, L., Shupliakov, O., Saenger, W., and Haucke, V. (2010). Molecular basis for SH3 domain regulation of F-BAR-mediated membrane deformation. *PNAS* *107*, 8213–8218.
- Rapoport, I., Boll, W., Yu, A., Bocking, T., and Kirchhausen, T. (2008). A Motif in the Clathrin Heavy Chain Required for the Hsc70/Auxilin Uncoating Reaction. *Mol. Biol. Cell* *19*, 406–413.
- Reubold, T.F., Eschenburg, S., Becker, A., Leonard, M., Schmid, S.L., Vallee, R.B., Kull, F.J., and Manstein, D.J. (2005). Crystal structure of the GTPase domain of rat dynamin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13093–13098.
- Reubold, T.F., Faelber, K., Plattner, N., Posor, Y., Ketel, K., Curth, U., Schlegel, J., Anand, R., Manstein, D.J., Noé, F., et al. (2015a). Crystal structure of the dynamin tetramer. *Nature* *525*, 404–408.
- Reubold, T.F., Faelber, K., Plattner, N., Posor, Y., Ketel, K., Curth, U., Schlegel, J., Anand, R., Manstein, D.J., Noé, F., et al. (2015b). Crystal structure of the dynamin tetramer. *Nature* *525*, 404–408.
- Ringstad, N., Gad, H., Löw, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O., and De Camilli, P. (1999). Endophilin/sh3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* *24*, 143–154.
- Rizzoli, S.O. (2014). Synaptic vesicle recycling. *33*, 2014.
- Robinson, M.S. (1994). The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 538–544.
- Römer, W., Berland, L., Chambon, V., Gaus, K., Windschiegel, B., Tenza, D., Aly, M.R.E., Fraisier, V., Florent, J.C., Perrais, D., et al. (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* *450*, 670–675.
- Rosenbluth, J. (1964). the Distribution of Exogenous Ferritin in Toad Spinal Ganglia and the Mechanism of Its Uptake By Neurons. *J. Cell Biol.* *23*, 307–325.
- Rosendale, M., Julli??, D., Choquet, D., and Perrais, D. (2017). Spatial and Temporal Regulation of Receptor Endocytosis in Neuronal Dendrites Revealed by Imaging of Single Vesicle Formation. *Cell Rep.* *18*, 1840–1847.

- Rosendale, M., Van, T.N.N., GRILLO-BOSH, D., GAUTHEREAU, I., CLAVEROL, S., CHOQUET, D., SAINLOS, M., and PERRAIS, D. (2018). Functional recruitment of dynamin requires multimeric interactions for efficient endocytosis. *BioRxiv* 1–34.
- Rossier, O., Oceau, V., Sibarita, J.B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albigès-Rizo, C., Tampé, R., et al. (2012). Integrins  $\beta$  1 and  $\beta$  3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1057–1067.
- Roth, T., and Porter, K. (1964). Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. *L. J. Cell Biol.* *20*, 313–332.
- Rothnie, A., Clarke, A.R., Kuzmic, P., Cameron, A., and Smith, C.J. (2011). A sequential mechanism for clathrin cage disassembly by 70-kDa heat-shock cognate protein (Hsc70) and auxilin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 6927–6932.
- Rougerie, P., Miskolci, V., and Cox, D. (2013). Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: Role and regulation of the actin cytoskeleton. *Immunol. Rev.* *256*, 222–239.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A., and De Camilli, P. (2006a). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* *441*, 528–531.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A., and De Camilli, P. (2006b). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Lett. to Nat.* *441*, 528–531.
- Roux, A., Koster, G., Lenz, M., Sorre, B., Manneville, J.-B., Nassoy, P., and Bassereau, P. (2010). Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 4141–4146.
- Russell, R.C., Yuan, H.-X., and Guan, K.-L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res.* *24*, 42–57.
- Saheki, Y., and De Camilli, P. (2012). Synaptic vesicle endocytosis. 1–30.
- Saleem, M., Morlot, S., Hohendahl, A., Manzi, J., Lenz, M., and Roux, A. (2015). A balance between membrane elasticity and polymerization energy sets the shape of spherical clathrin coats. *Nat. Commun.* *6*.
- Salim, K., J.Bottomley, M., Querfurthl, E., J.Zvebill, M., Gout, I., Scaife, R., L.Margolis, R., Gigg, R., Smith, C. I. E., C.Driscoll, P., et al. (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase Kamran. *EMBO J.* *15*, 6241–6250.
- Salisbury, J.L., Condeelis, J.S., and Satir, P. (1980). Role of coated vesicles, microfilaments, and calmodulin in receptor-mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells. *J. Cell Biol.* *87*, 132–141.
- Sankaranarayanan, S., De Angelis, D., Rothman, J.E., and Ryan, T.A. (2000). The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys. J.* *79*, 2199–2208.
- Saxton, M.J., and Jacobson, K. (1997). SINGLE-PARTICLE TRACKING: Applications to Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *26*, 373–399.
- Scheele, U., Kalthoff, C., and Ungewickell, E. (2001). Multiple Interactions of Auxilin 1 with Clathrin and the AP-2 Adaptor Complex. *J. Biol. Chem.* *276*, 36131–36138.
- Schlossman, D.M., Schmid, S.L., Braell, W.A., and Rothman, J.E. (1984). An enzyme that removes clathrin coats: Purification of an uncoating ATPase. *J. Cell Biol.* *99*, 723–733.
- Schmid, E.M., Ford, M.G.J., Burtsey, A., Praefcke, G.J.K., Peak-Chew, S.Y., Mills, I.G., Benmerah, A., and McMahon, H.T. (2006). Role of the AP-2  $\beta$ -appendage hub in recruiting partners for clathrin-

coated vesicle assembly. *PLoS Biol.* *4*, 1532–1548.

- Schweitzer, J.K., Burke, E.E., Goodson, H. V., and D'Souza-Schorey, C. (2005). Endocytosis resumes during late mitosis and is required for cytokinesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 41628–41635.
- Scott, B.L., Sochacki, K.A., Low-Nam, S.T., Bailey, E.M., Luu, Q.A., Hor, A., Dickey, A.M., Smith, S., Kerkvliet, J.G., Taraska, J.W., et al. (2018). Membrane bending occurs at all stages of clathrin-coated vesicle assembly and defines endocytic dynamics. *Nat. Commun.* *9*.
- Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S., and Suetsugu, S. (2011). Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J. Cell Sci.* *124*, 2032–2040.
- Sever, S., Damke, H., and Schmid, S.L. (2000). Garrotes, Springs, Ratchets, and Whips: Putting Dynamin Models to the Test. *Traffic* *3*, 385–392.
- Shen, Y., Rosendale, M., Campbell, R.E., and Perrais, D. (2014). pHuji, a pH-sensitive red fluorescent protein for imaging of exo- and endocytosis. *J. Cell Biol.* *207*, 419–432.
- Shevchuk, A.I., Novak, P., Taylor, M., Diakonov, I.A., Ziyadeh-Isleem, A., Bitoun, M., Guicheney, P., Lab, M.J., Gorelik, J., Merrifield, C.J., et al. (2012). An alternative mechanism of clathrin-coated pit closure revealed by ion conductance microscopy. *J. Cell Biol.* *197*, 499–508.
- Shimohama, S., Kamiya, S., Fujii, M., Ogawa, T., Kanamori, M., Kawamata, J., Imura, T., Taniguchi, T., and Yagisawa, H. (1998). Mutation in the pleckstrin homology domain of the human phospholipase C- $\delta$ 1 gene is associated with loss of function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *245*, 722–728.
- Shivas, J.M., Morrison, H.A., Bilder, D., and Skop, A.R. (2010). Polarity and endocytosis: Reciprocal regulation. *Trends Cell Biol.* *20*, 445–452.
- Shnyrova, A. V., Bashkirov, P. V., Akimov, S.A., Pucadyil, T.J., Zimmerberg, J., Schmid, S.L., and Frolov, V.A. (2013). Geometric Catalysis of Membrane Fission Driven by Flexible Dynamin Rings. *PLoS Biol.* *11*, 1433–1437.
- Shpetner, H.S., and Vallee, R.B. (1989). Identification of Dynamin, a Novel Mechanochemical Enzyme that Mediates Interactions between Microtubules. *Cell* *59*, 421–432.
- Shpetner, H.S., Herskovits, J.S., and Vallee, R.B. (1996). A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits. *J. Biol. Chem.* *271*, 13–16.
- Shupliakov, O., Löw, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De, C.P., and Brodin, L. (1997a). Synaptic Vesicle Endocytosis Impaired by Disruption of Dynamin-SH3 Domain Interactions. *Science* (80- ). *276*, 259–263.
- Shupliakov, O., Löw, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De Camilli, P., and Brodin, L. (1997b). Synaptic Vesicle Endocytosis Impaired by Disruption of Dynamin-SH3 Domain Interactions. *Science* (80- ). *276*, 259–264.
- Sibarita, J.B. (2014). High-density single-particle tracking: Quantifying molecule organization and dynamics at the nanoscale. *Histochem. Cell Biol.* *141*, 587–595.
- Sidiropoulos, P.N.M., Miehe, M., Bock, T., Tinelli, E., Oertli, C.I., Kuner, R., Meijer, D., Wollscheid, B., Niemann, A., and Suter, U. (2012). Dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy highlight the importance of clathrin-mediated endocytosis in myelination. *Brain* *135*, 1395–1411.
- Simpson, F., Hussain, N.K., Qualmann, B., Kelly, R.B., Kay, B.K., McPherson, P.S., and Schmid, S.L. (1999). SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat Cell Biol* *1*, 119–124.
- Singh, M., Jadhav, H.R., and Bhatt, T. (2017). Dynamin Functions and Ligands: Classical Mechanisms

Behind. 123–134.

- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., et al. (2011). Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae. *Cell* 144, 402–413.
- Sochacki, K.A., and Taraska, J.W. (2018). From Flat to Curved Clathrin: Controlling a Plastic Ratchet. *Trends Cell Biol.* 1–16.
- Sojakka, K., Punnonen, E.L., and Marjomäki, V.S. (1999). Isoproterenol inhibits fluid-phase endocytosis from early to late endosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 161–169.
- Song, B.D., Leonard, M., and Schmid, S.L. (2004). Dynamin GTPase domain mutants that differentially affect GTP binding, GTP hydrolysis, and clathrin-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 40431–40436.
- Sönnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J., and Zerial, M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.* 149, 901–913.
- Sorkin, A., and Von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: Intertwining molecular networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 609–622.
- Soykan, T., Maritzen, T., and Haucke, V. (2016). Modes and mechanisms of synaptic vesicle recycling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 39, 17–23.
- Soykan, T., Kaempfer, N., Sakaba, T., Vollweber, D., Goerdeler, F., Puchkov, D., Kononenko, N.L., and Haucke, V. (2017). Synaptic Vesicle Endocytosis Occurs on Multiple Timescales and Is Mediated by Formin-Dependent Actin Assembly. *Neuron* 93, 854–866.e4.
- Srinivasan, S., Burckhardt, C.J., Bhawe, M., Chen, Z., Chen, P.-H., Wang, X., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2018). A non-canonical role for dynamin-1 in regulating early stages of clathrin-mediated endocytosis in non-neuronal cells.
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 513–525.
- Stoeber, M., Stoeck, I.K., Hänni, C., Ernst, C.K., Balistreri, G., and Helenius, A. (2012). Oligomers of the ATPase EHD2 confine caveolae to the plasma membrane through association with actin. *Med. Today* 31, 2350–2364.
- Stowell, M.H.B., Marks, B., Wigge, P., and McMahon, H.T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: Evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat. Cell Biol.* 1, 27–32.
- Sundborger, A.C., and Hinshaw, J.E. (2014). Regulating dynamin dynamics during endocytosis. *F1000Prime Rep.* 6, 1–9.
- Sundborger, A., Soderblom, C., Vorontsova, O., Evergren, E., Hinshaw, J.E., and Shupliakov, O. (2011). An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J. Cell Sci.* 124, 133–143.
- Sundborger, A.C., Fang, S., Heymann, J.A., Ray, P., Chappie, J.S., and Hinshaw, J.E. (2014). A dynamin mutant defines a superconstricted pre-fission state. *Cell Rep.* 8, 734–742.
- Swanson, J.A., Johnson, M.T., Beningo, K., Post, P., Mooseker, M., and Araki, N. (1999). A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 3), 307–316.
- Sweitzer, S.M., and Hinshaw, J.E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93, 1021–1029.
- Takeda, T., Kozai, T., Yang, H., Ishikuro, D., Seyama, K., Kumagai, Y., Abe, T., Yamada, H., Uchihashi, T.,

- Ando, T., et al. (2018). Dynamic clustering of dynamin-amphiphysin helices regulates membrane constriction and fission coupled with GTP hydrolysis. *Elife* 7, 1–19.
- Takei, K., McPherson, P.S., Schmid, S.L., and Camilli, P. De (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP- $\gamma$ S in nerve terminals. *Nature* 374, 186–190.
- Takei, K., Haucke, V., Slepnev, V., Farsad, K., Salazar, M., Chen, H., and De Camilli, P. (1998). Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell* 94, 131–141.
- Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V., and De Camilli, P. (1999). Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.*
- Taylor, M.J., Perrais, D., and Merrifield, C.J. (2011). A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol.* 9.
- Taylor, M.J., Lampe, M., and Merrifield, C.J. (2012). A feedback loop between dynamin and actin recruitment during clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol.* 10.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., and van Deurs, B. (2002). Caveolae Are Highly Immobile Plasma Membrane Microdomains, Which Are not Involved in Constitutive Endocytic Trafficking. *Mol. Biol. Cell* 13, 238–250.
- Tooze, S.A., Dooley, H.C., Jefferies, H.B.J., Joachim, J., Judith, D., Lamb, C.A., Razi, M., and Wirth, M. (2015). Assessing mammalian autophagy.
- Traub, L.M. (2009). Tickets to ride: Selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 583–596.
- Traub, L.M., and Bonifacino, J.S. (2013). Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, 1–23.
- Tuma, P.L., and Collins, C.A. (1994). Activation of dynamin GTPase by acidic phospholipids and endogenous rat brain vesicles. *J. Biol. Chem.* 268, 30842–30847.
- Umasankar, P.K., Sanker, S., Thieman, J.R., Chakraborty, S., Wendland, B., Tsang, M., and Traub, L.M. (2012). Distinct and separable activities of the endocytic clathrin-coat components Fcho1/2 and AP-2 in developmental patterning. *Nat. Cell Biol.* 14, 488–501.
- Ungewickell, E.J., Ungewickell, H., Holstein, S., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L., and Eisenberg, E. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 378, 632–635.
- Vallis, Y., Wigge, P., Marks, B., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (1999). Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.* 9, 257–260.
- Vater, C.A., Raymond, C.K., Ekena, K., Howald-Stevenson, I., and Stevens, T.H. (1992). The VPS1 protein, a homolog of dynamin required for vacuolar protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*, is a GTPase with two functionally separable domains. *J. Cell Biol.* 119, 773–786.
- Warnock, D.E., Hinshaw, J.E., and Schmid, S.L. (1996). Cell Biology and Metabolism : Dynamin Self-assembly Stimulates Its GTPase Activity Dynamin Self-assembly Stimulates Its GTPase Activity \*. 271, 22310–22314.
- Watanabe, S., and Boucrot, E. (2017). Fast and ultrafast endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 47, 64–71.
- Watanabe, S., Rost, B.R., Camacho-Pérez, M., Davis, M.W., Söhl-Kielczynski, B., Rosenmund, C., and Jorgensen, E.M. (2013). Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* 504, 242–247.
- Watanabe, S., Trimbuch, T., Camacho-Pérez, M., Rost, B.R., Brokowski, B., Söhl-Kielczynski, B., Felies, A., Davis, M.W., Rosenmund, C., and Jorgensen, E.M. (2014). Clathrin regenerates synaptic

vesicles from endosomes. *Nature* 515, 228–233.

- Watanabe, S., Mamer, L.E., Raychaudhuri, S., Luvsanjav, D., Eisen, J., Trimbuch, T., Söhl-Kielczynski, B., Fenske, P., Milosevic, I., Rosenmund, C., et al. (2018). Synaptojanin and Endophilin Mediate Neck Formation during Ultrafast Endocytosis. *Neuron* 98, 1184–1197.e6.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 872–884.
- Wigge, P., Vallis, Y., and McMahon, H.T. (1997). Inhibition of receptor-mediated endocytosis by the amphiphysin SH3 domain. *Curr. Biol.* 7, 554–560.
- Wilsbach, K., and Paynel, G.S. (1993). Vps1p, a member of the dynamin GTPase family, necessary for Golgi membrane protein retention in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 12, 3049–3059.
- Wu, M., Huang, B., Graham, M., Raimondi, A., Heuser, J.E., Zhuang, X., and De Camilli, P. (2010). Coupling between clathrin-dependent endocytic budding and F-BAR-dependent tubulation in a cell-free system. *Nat. Cell Biol.* 12, 902–908.
- Wu, X., Zhao, X., Baylor, L., Kaushal, S., Eisenberg, E., and Greene, L.E. (2001). Clathrin exchange during clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 155, 291–300.
- Xing, Y., Böcking, T., Wolf, M., Grigorieff, N., Kirchhausen, T., and Harrison, S.C. (2010). Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: Mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *EMBO J.* 29, 655–665.
- Xu, B., Teng, L.H. on., Silva, S.D. aniel. da, Bijian, K., Al Bashir, S., Jie, S., Dolph, M., Alaoui-Jamali, M.A., and Bismar, T.A. (2014). The significance of dynamin 2 expression for prostate cancer progression, prognostication, and therapeutic targeting. *Cancer Med.* 3, 14–24.
- Yamashita, T., Hige, T., and Takahashi, T. (2005a). Vesicle endocytosis requires dynamin-dependent GTP hydrolysis at a fast CNS synapse. *Science* (80- ). 307, 124–127.
- Yamashita, T., Hige, T., and Takahashi, T. (2005b). Vesicle endocytosis requires dynamin-dependent GTP hydrolysis at a fast CNS synapse. *Science* (80- ). 307, 124–127.
- Yoshida, A., Sakai, N., Uekusa, Y., Imaoka, Y., Itagaki, Y., Suzuki, Y., and Yoshimura, S.H. (2018). Morphological changes of plasma membrane and protein assembly during clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol.* 16.
- Yoshida, Y., Kinuta, M., Abe, T., Liang, S., Araki, K., Cremona, O., Di Paolo, G., Moriyama, Y., Yasuda, T., De Camilli, P., et al. (2004). The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J.* 23, 3483–3491.
- Zamanian, J.L., and Kelly, R.B. (2003). Intersectin 1L Guanine Nucleotide Exchange Activity Is Regulated by Adjacent src Homology 3 Domains That Are Also Involved in Endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 14, 1624–1637.
- Zhang, P., and Hinshaw, J.E. (2001). Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat. Cell Biol.* 3, 922–926.
- Zheng, J., Cahill, S.M., Lemmon, M.A., Fushman, D., Schlessinger, J., and Cowburn, D. (1996). Identification of the binding site for acidic phospholipids on the PH domain of dynamin: Implications for stimulation of GTPase activity. *J. Mol. Biol.* 255, 14–21.
- Zhu, L., Su, M., Lucast, L., Liu, L., Netzer, W.J., Gandy, S.E., and Cai, D. (2012). Dynamin 1 Regulates Amyloid Generation through Modulation of BACE-1. *PLoS One* 7, 1–10.
- Zoncu, R., Perera, R.M., Sebastian, R., Nakatsu, F., Chen, H., Balla, T., Ayala, G., Toomre, D., and De Camilli, P. V. (2007). Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3793–3798.

- Züchner, S., Mersiyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., et al. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36, 449–451.
- Züchner, S., Noureddine, M., Kennerson, M., Verhoeven, K., Claeys, K., Jonghe, P. De, Merory, J., Oliveira, S.A., Speer, M.C., Stenger, J.E., et al. (2005). Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Genet.* 37, 289–294.

**Résumé :** L'endocytose dépendante de la clathrine (EDC), c'est-à-dire la formation de vésicules recouvertes de clathrine (VRC) à partir de la membrane plasmique, est un processus essentiel dans les cellules eucaryotes. Au cours de l'EDC, la GTPase dynamine est recrutée au cou de la VRC naissante où elle s'oligomérisse en hélice. Les changements de conformation induits par l'hydrolyse du GTP catalysent la scission du cou vésiculaire. Ce processus a été étudié en détail par reconstitution *in vitro* sur des tubules membranaires, mais il doit être établi dans des cellules vivantes, où les interactions de la dynamine avec d'autres protéines comme l'amphiphysine sont critiques. L'imagerie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) avec le protocole pH pulsé (ppH) sur cellules vivantes permet la détection de la formation de VRC avec une résolution spatiale (~100 nm) et temporelle (2 s) élevée. Ce protocole a révélé que la dynamine présente un recrutement biphasique aux puits recouverts de clathrine (PRC) en maturation avec un pic au moment de la scission mais les paramètres de son recrutement dans les cellules vivantes restent peu clairs. Pour déterminer ces paramètres, j'ai utilisé des techniques d'imagerie sur cellules vivantes pour étudier le recrutement de la dynamine à l'échelle globale et à l'échelle de la molécule unique lors de perturbations aiguës de sa fonction. Mes résultats de thèse ont montré que la dynamine est recrutée à la membrane plasmique, diffuse à l'extérieur des PRC et y est transitoirement piégée. De plus, j'ai déterminé avec des dynamines mutées (1) que le domaine PRD de la dynamine est crucial pour son recrutement aux PRC ; (2) que le domaine PH est important pour la scission vésiculaire mais pas pour son recrutement aux PRC ou à la membrane plasmique. Enfin, j'ai observé que la dynamine s'échange en permanence avec un pool extra-PRC, ce qui permettrait son recrutement ultérieur par l'ajout de nouveaux sites de liaison et sa capacité à rétrécir le cou des vésicules suite à l'hydrolyse du GTP. En conclusion, ces données suggèrent qu'aux PRC, les molécules de dynamine (1) sont constamment échangées ; (2) diffusent à des taux similaires tout au long du processus de formation, maturation et scission des vésicules; et (3) l'activité GTPase de la dynamine contribue à la maturation et à la scission des VRC.

**Mots-clés :** Endocytose, dynamine, protocole ppH, sptPALM, FRAP

**Abstract :** Clathrin-mediated endocytosis (CME), the formation of clathrin-coated vesicles (CCV) from the plasma membrane, is an essential process in eukaryotic cells. During CME, the GTPase dynamin is recruited to the neck of nascent CCV where it oligomerizes into helical filaments. Conformational changes induced by the hydrolysis of GTP catalyze the scission of the vesicle neck. This process has been studied in detail with *in vitro* reconstitution on membrane tubules but it needs to be established in living cells, where interactions between dynamin and other proteins such as amphiphysin are critical. Live cell total internal reflection fluorescence (TIRF) imaging with the pulsed pH (ppH) assay allows the detection of CCV formation with high spatial (~100 nm) and temporal (2 s) resolutions. It has revealed that dynamin is recruited to maturing clathrin-coated pits (CCP) in two phases with a peak at the time of scission but the parameters of its recruitment in living cells remain unclear. To determine these parameters, we have performed live cell imaging of dynamin recruitment at collective and single molecule levels during acute perturbations of its function. My PhD results showed that dynamin is recruited to the plasma membrane, diffuses outside of CCP and is trapped at CCP. Furthermore, we determined with mutated dynamins that (1) the PRD domain of dynamin is crucial for its recruitment at CCP; (2) the PH domain is important for vesicular scission but not for recruitment to CCP or to the plasma membrane. Finally, I observed that dynamin exchanges with an extra-CCP pool at all times: this would allow for its further recruitment by addition of new binding sites and its ability to narrow the vesicle neck after GTP hydrolysis. Altogether, these data suggest that in CCP dynamin molecules (1) are constantly exchanged; (2) diffuse at similar rates throughout the entire process of vesicle formation, from maturation until scission; and (3) that dynamin's GTPase activity contributes to CCP maturation and scission.

**Keywords :** Endocytosis, dynamin, ppH protocol, sptPALM, FRAP