

Les facteurs d'échange à domaine Sec7

A. Généralités

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

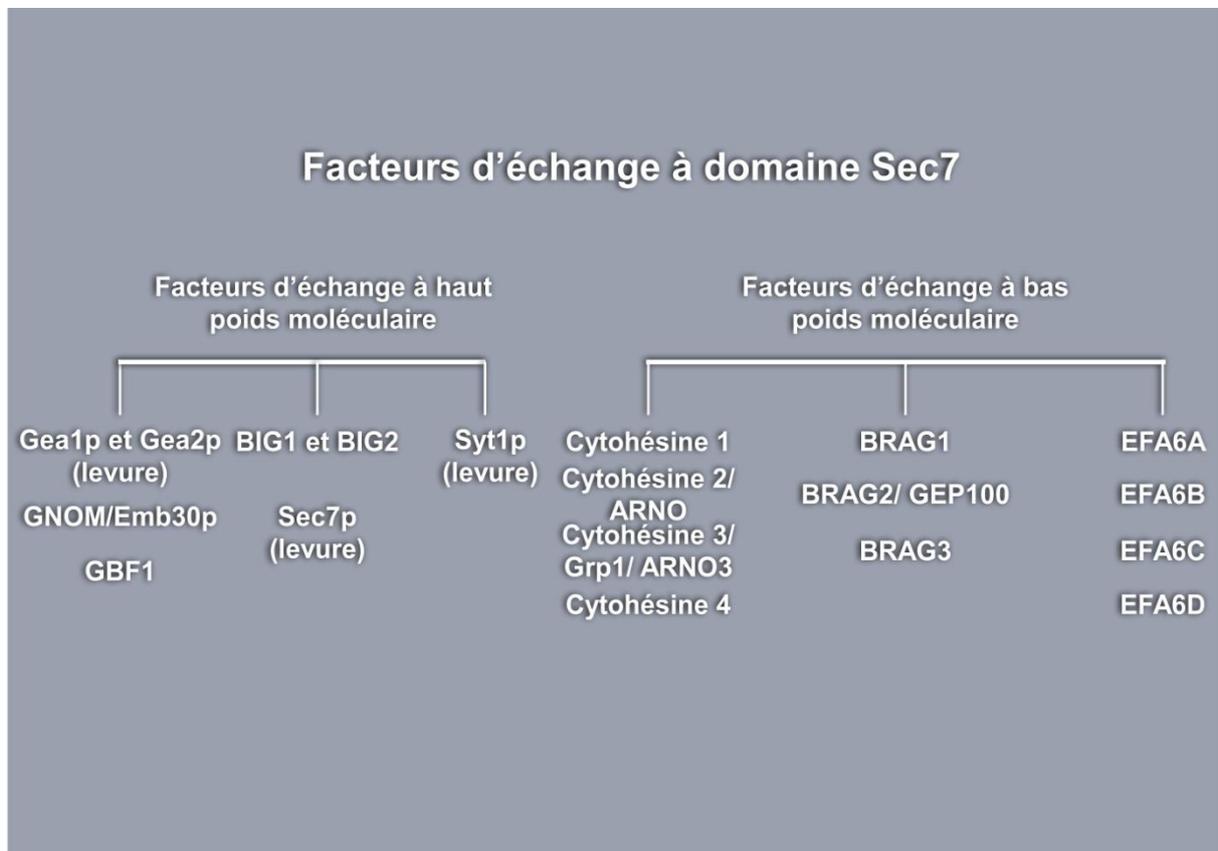


Figure 28 : Famille des facteurs d'échange à domaine Sec7 (adapté de (Casanova, 2007; Jackson and Casanova, 2000)).

La première sous-famille est composée de facteurs d'échange possédant un haut poids moléculaire, supérieur à 100kDa. On retrouve dans cette sous-famille une première classe de facteurs d'échange composée des protéines de levure Gea1p et Gea2p, la protéine GNOM/Emb30p et la protéine GBF1. La deuxième classe des facteurs d'échange à haut poids moléculaire est composée de la protéine de levure Sec7p et des protéines BIG1 et BIG2. La protéine de levure Syt1p constitue à elle seule la troisième classe. La majorité des protéines de cette sous-classe est localisée principalement au niveau de l'appareil de Golgi.

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

B. Structure

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

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

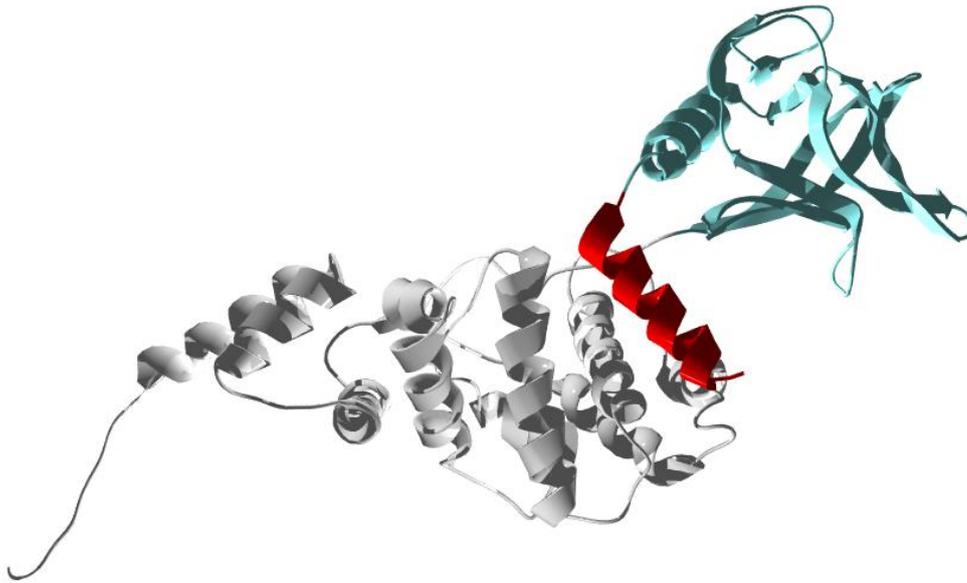


Figure 29 : Représentation de la structure 3D d'un domaine Sec7 d'ARNO (d'après Dinitto et al. 2007).

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

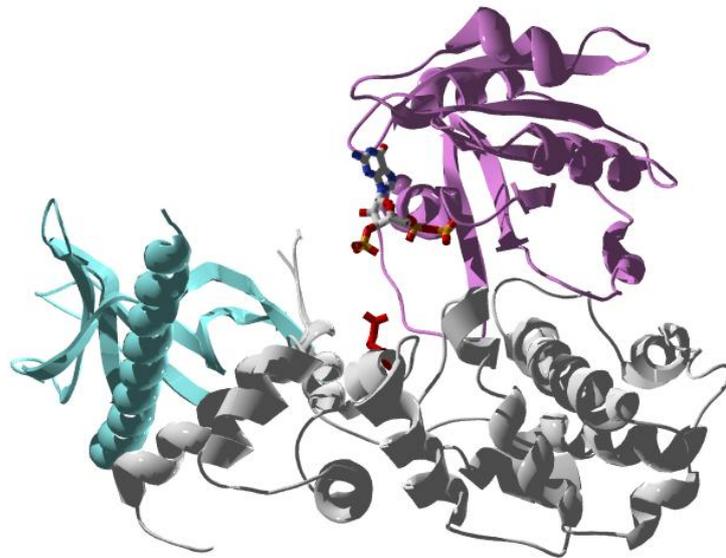


Figure 30 : Représentation de la structure 3D du complexe Arf1/domaine Sec7 de BRAG2 (d'après Aizel et al. 2013).

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

C. Les facteurs d'échange à haut poids moléculaire

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

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

D. La famille des cytohésines

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

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

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

E. La famille des BRAG

La famille des protéines BRAG est composée de trois membres : les protéines BRAG1, BRAG2 (ou GEP100) et BRAG3 possédant chacune au moins 2 isoformes. Bien que plusieurs expériences aient mis en évidence que ces protéines étaient capables d'activer les protéines Arf, aucune spécificité évidente n'a encore été démontrée.

Différentes études ont mis en évidence l'implication de ces protéines dans différents processus biologiques. Ainsi elles jouent un rôle dans l'endocytose et notamment celle de l'intégrine $\beta 1$ (Dunphy et al., 2006), la phagocytose (Someya et al., 2010), l'adhésion cellulaire (Hiroi et al., 2006; Someya et al., 2006), l'apoptose (Someya et al., 2006) et l'angiogénèse (Hongu et al., 2015). Une étude a mis en évidence une voie de signalisation dépendante du récepteur à l'EGF et des protéines GEP100, Arf6 et AMAP1 impliquée dans l'invasion des cellules cancéreuses et le développement de métastases (Hashimoto et al., 2011). Suite à l'activation du récepteur à l'EGF, GEP100 interagit directement, par l'intermédiaire de son domaine PH, avec les phosphotyrosine 1068 et 1086 de ce dernier. Cette interaction permet l'activation d'Arf6 qui va, par l'intermédiaire de son effecteur AMAP1, intervenir dans la formation d'invadopodes, la dégradation et la phagocytose de la matrice extracellulaire et la perte de l'adhésion cellulaire.

F. Mécanismes de régulation

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

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

G. Le facteur d'échange EFA6

1. Structure

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

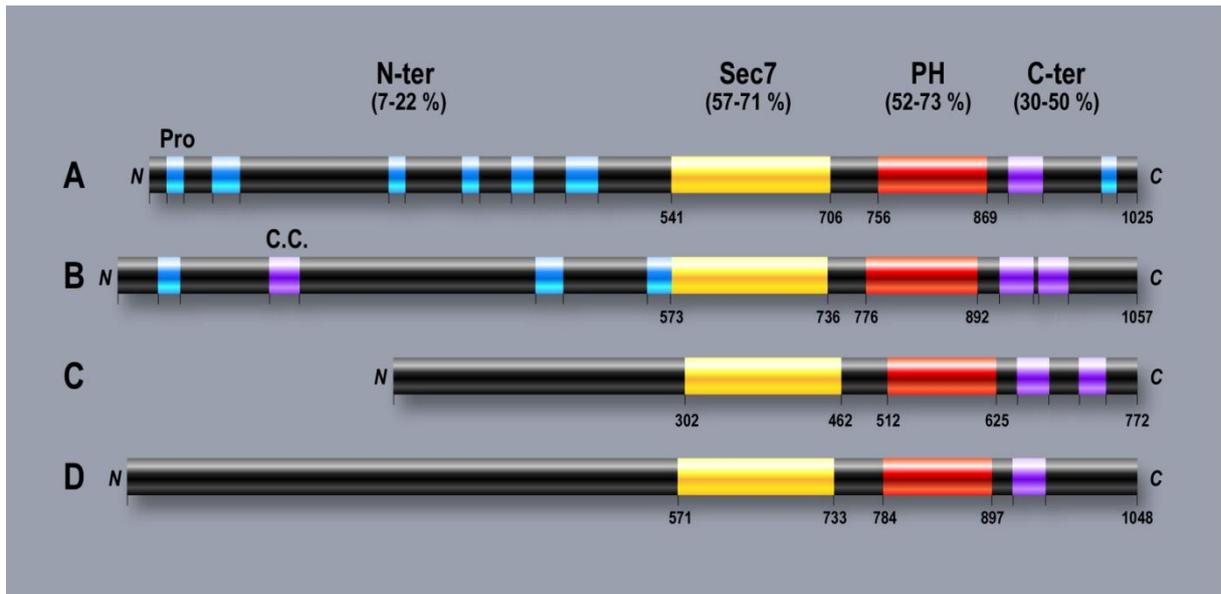


Figure 31 : Structure des isoformes EFA6.

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

2. Fonctions

a) *EFA6 dans le remodelage du cytosquelette d'actine*

Des études menées au laboratoire ont démontré qu'EFA6, tout comme Arf6, est impliquée dans la réorganisation et l'assemblage du cytosquelette d'actine (Derrien et al., 2002; Franco et al., 1999). En effet, on retrouve dans des cellules Hela surexprimant la forme sauvage d'EFA6 une accumulation et une co-localisation de l'actine filamenteuse et d'EFA6 au niveau des replis membranaires (Derrien et al., 2002; Franco et al., 1999). Par l'utilisation de différents mutants, le domaine C-terminal d'EFA6 a pu être identifié comme étant le domaine responsable de ce remodelage. La surexpression dans les cellules des mutants EFA6^{E242K} et EFA6_{ΔSec7}, qui ne possèdent pas d'activité catalytique, entraîne la formation d'extensions membranaires riches en actine. En revanche, on constate, dans les cellules surexprimant le mutant ne possédant pas le domaine C-terminal, une perte de ce phénotype

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

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

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

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

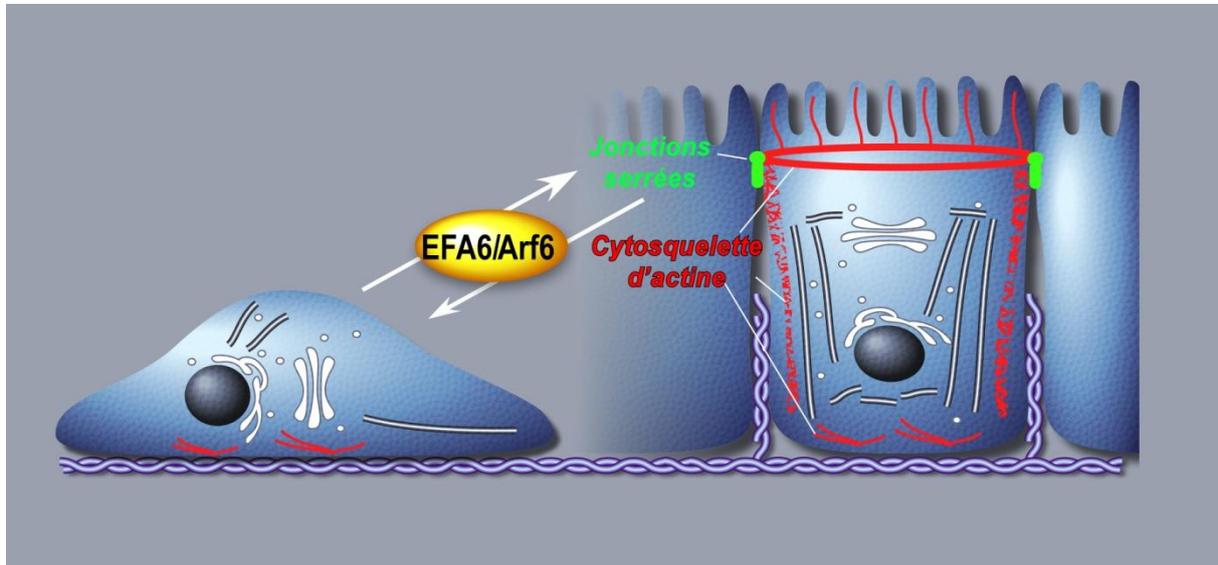


Figure 32 : Rôle d'EFA6 et d'Arf6 dans la mise en place de la polarité épithéliale.

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

c) EFA6 dans l'internalisation et le recyclage

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

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

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

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

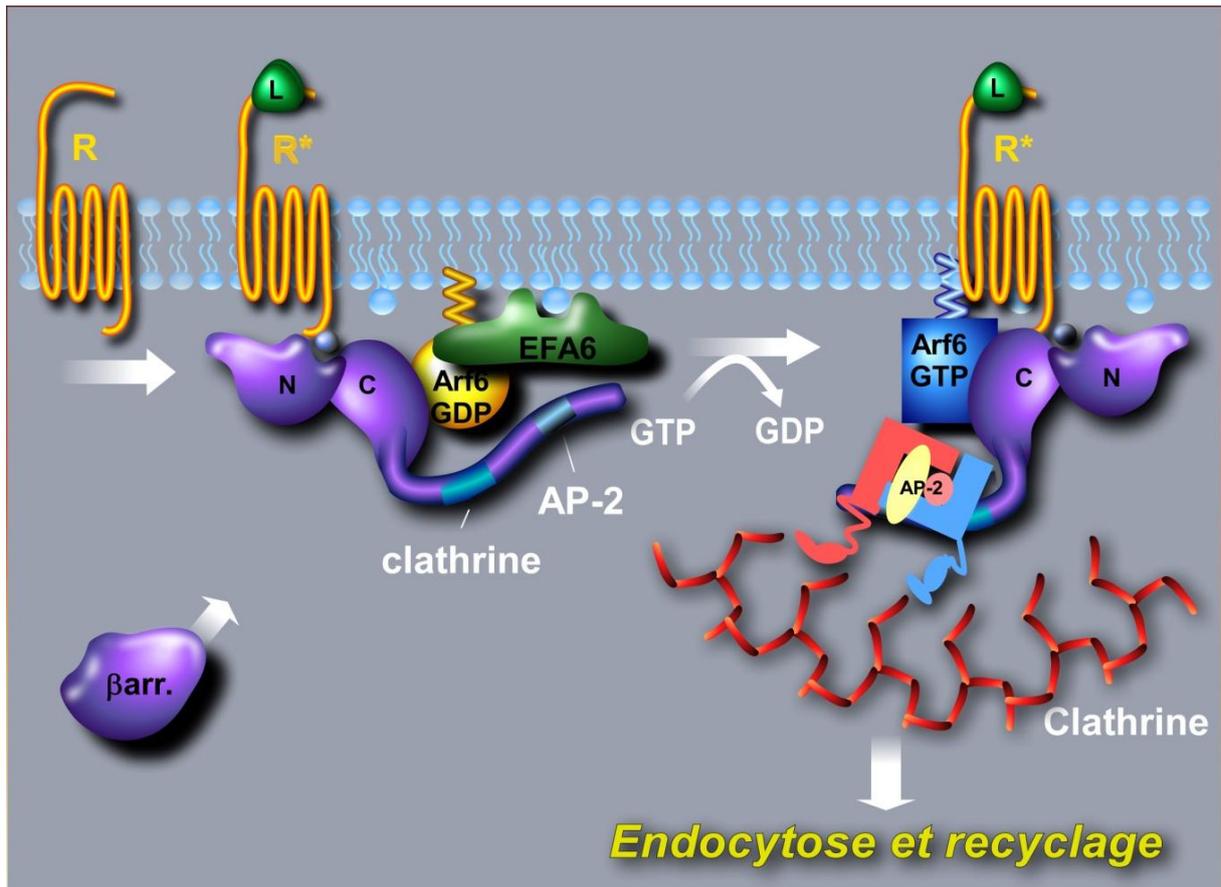


Figure 33 : Rôle d'EFA6 et d'Arf6 dans l'internalisation du récepteur β 2-adrénergique.

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

d) EFA6 dans les pathologies

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

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

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

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

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

I. Contexte et objectif de l'étude

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

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

Dans le but de valider cette interaction nous avons utilisé une approche biochimique avec des expériences de pull-down sur des lysats cellulaires sur-exprimant nos protéines d'intérêt ainsi que sur des protéines recombinantes purifiées. Nous avons également réalisé des expériences de flottaison sur gradient de sucrose à l'aide de vésicules lipidiques artificielles avec des degrés de courbure compatibles avec une membrane plane ou avec un puits d'endocytose en formation. Lors des expériences de flottaison, les protéines d'intérêt sont incubées en présence de liposomes puis un gradient de sucrose est déposé sur ce mélange. Suite à une ultracentrifugation, les liposomes de faible densité se retrouvent dans la fraction

«top» correspondant à la partie supérieure du gradient de sucrose. Les protéines capables d'interagir avec les liposomes sont elles aussi entraînées dans la fraction «top», les autres quant à elles restent dans la fraction «bottom». A cela ce sont ajoutées des expériences de biologie cellulaire et de microscopie électronique.

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

II. Article

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

Sonia Boulakirba^a, Eric Macia^a, Mariagrazia Partisani^a, Sandra Lacas-Gervais^b, Frédéric Brau^a, Frédéric Luton^a, and Michel Franco^{a,1}

^aInstitut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 7275, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Nice Sophia Antipolis, 06560 Valbonne, France; and ^bCentre Commun de Microscopie Appliquée, Université de Nice Sophia Antipolis, 06103 Nice, France

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

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

small GTP-binding proteins | membrane curvature | vesicular trafficking

The ADP ribosylation factor family, which includes six members, is known to regulate different stages of vesicular trafficking (reviewed in refs. 1, 2). The most abundant isoform, Arf1, controls the membrane trafficking at the level of the Golgi apparatus by regulating in a GTP-dependent manner the recruitment of the COPI coat complex (3–5) and the two clathrin adaptors AP-1 (6, 7) and GGAs (8) onto the Golgi membranes. By activating lipid-modifying enzymes, Arf1 is able to change the lipid composition of the donor compartment membrane, thus facilitating membrane dynamic (9–12). ADP-ribosylation factor 6 (Arf6), the most distant isoform, is thought to regulate plasma membrane and endosomal trafficking. Similarly to Arf1, Arf6 activates the PLD (13, 14) and the type I PI4P5K (15, 16) to produce, respectively, phosphatidic acid, which is a fusogenic lipid, and phosphatidylinositol 4–5 bisphosphate, which is known to regulate clathrin-dependent endocytosis. Arf6 and PIP₂ cooperate (at least in vitro) to recruit AP-2 onto lipid membranes, suggesting a role for Arf6 in the formation of clathrin-coated pits (17). In addition to this putative role during the initial steps of internalization, Arf6 has been shown to interact and recruit Nm23-H1, a protein believed to control the dynamin-dependent fission of endocytic vesicles (18). These different observations have clarified the molecular basis of the role of Arf6 in clathrin-dependent and -independent endocytosis. Arf6 has been shown to be involved in the internalization of

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

EFA6 belongs to the Sec7 domain-containing protein family that acts as guanine nucleotide exchange factor (GEF) for Arf proteins (reviewed in ref. 29). In humans, the EFA6 protein family contains four isoforms, and shares a common domain organization consisting of a Sec7 domain bearing the catalytic activity, a pleckstrin homology domain responsible for the plasma membrane localization by interacting with PIP₂ and F-actin, a C-terminal region containing a putative coiled-coil motif and two proline rich motifs responsible for F-actin reorganization, and an N-terminal domain of unknown function whose size and primary sequence are the least conserved across the four isoforms. EFA6 is highly selective for Arf6, and is known to coordinate plasma membrane trafficking with actin cytoskeleton remodeling (30). EFA6 interacts directly

Significance

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

Author contributions: F.L. and M.F. designed research; S.B., E.M., M.P., and S.L.-G. performed research; S.B., E.M., F.B., F.L., and M.F. analyzed data; M.F. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: franco@ipmc.cnrs.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1401186111/-DCSupplemental.

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

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

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

Results

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

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

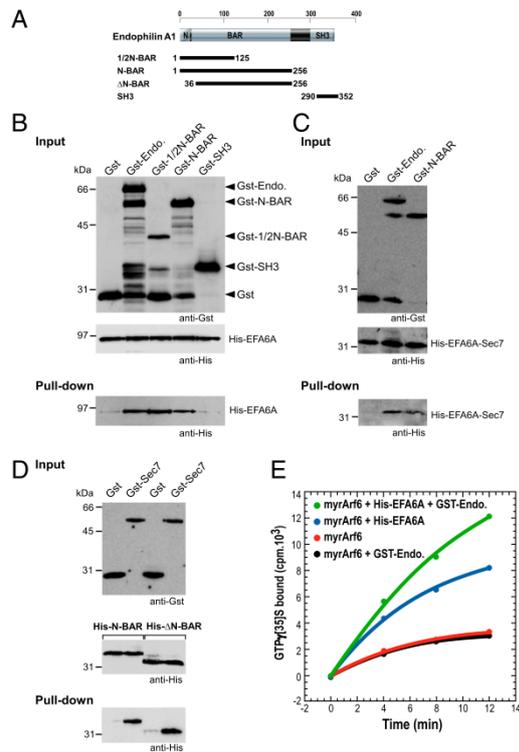


Fig. 1. Endophilin directly interacts with EFA6A and stimulates its GEF activity on Arf6. (A) Schematic representation of endophilin A1 and the different GST constructs used in this study. (B and C) GST pull-down of purified His-tagged EFA6A (B) or EFA6A-Sec7 domain (C) by different constructs of endophilin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

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

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