



HAL
open science

Recyclage membranaire : rôle de la protéine MICAL-L1 et de son partenaire PACSINE3

Romain Sikora

► **To cite this version:**

Romain Sikora. Recyclage membranaire : rôle de la protéine MICAL-L1 et de son partenaire PACSINE3. Biologie cellulaire. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB179 . tel-01590458

HAL Id: tel-01590458

<https://theses.hal.science/tel-01590458>

Submitted on 19 Sep 2017

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 de Doctorat de l'Université Paris 5 – René Descartes

Spécialité :

Biologie Cellulaire

Ecole Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

Présentée par :

Romain Sikora

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris Descartes

« **Recyclage membranaire :**
Rôle de la protéine MICAL-L1
et de son partenaire PACSINE3 »

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 16 Octobre 2015

Devant un jury composé de :

Président du Jury

Dr. Alexandre Benmerah, DR2

Rapporteur

Dr. Arnaud Échard, DR2

Rapporteur

Dr. Nicolas Vitale, DR2

Examineur

Dr. David Perrais, CR1

Directeur de Thèse

Dr. Ahmed Zahraoui, DR2

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier, en premier lieu, Ahmed Zahraoui, pour m'avoir formé, guidé et permis d'acquérir une autonomie de travail. Grâce à lui j'ai pu travailler sur un projet qui m'a permis de développer mes connaissances et compétences en biologie cellulaire et moléculaire mais aussi (et ça, ce n'était pas gagné...) en biochimie. Pendant plus de 3 ans et demi il a su me faire avancer, a toujours été là lorsque j'avais des doutes ou des interrogations. Sa connaissance du trafic intracellulaire et son expertise des protéines Rabs, sont une force que j'ai pu côtoyer au quotidien. J'aimerais aussi le remercier, de m'avoir permis d'approcher de nombreux appareils de microscopie, qui me fascinent depuis mes débuts dans la science et qui illustrent au mieux mon idiome favori « seeing is believing ».

Je tiens à remercier le Dr. Arnaud Échard et le Dr. Nicolas Vitale pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, et le Dr. David Perrais pour avoir accepté d'en être examinateur. Je souhaiterais adresser un remerciement particulier au Dr. Alexandre Benmerah, que j'ai rencontré à mes tous débuts à l'Institut Cochin en 2008, et qui m'a ensuite suivi durant mon Master, pour avoir accepté d'examiner mon travail mais également de présider mon jury.

Je désirerais ensuite remercier le Dr. Florence Niedergang et le Dr. Delphine Le-Roux de m'avoir accepté en 2008 dans leur équipe et de m'avoir donné goût à la recherche. C'est grâce à la confiance qu'elles ont mise en moi à l'époque que je n'ai jamais voulu lâcher ma pipette et que j'en suis arrivé là aujourd'hui. Merci pour leurs qualités scientifique et humaines.

Je remercie ensuite tous les membres de l'équipe « Biologie des phagocytes » avec qui j'ai partagé des moments scientifiques mais aussi humains, qui permettent d'aller au labo tous les jours avec le sourire. Merci Floriane, toi LE pilier du labo, pour tous tes conseils, ton soutien logistique, ta bonne humeur et ta ténacité face à ma faible affinité avec la blouse (« Romain, et la blouse ?!?! »). Merci Gaby, merci FMA, pour tout ce qu'on a pu partagé ensemble ces dernières années, que ce soit des avis sur les manips, le traitement de données, ou de nombreux fou rire. Merci aussi pour votre soutien pendant les moments de détresse scientifique ! Un grand merci à Audrey pour les échanges et les moments de détente (en Français, en Allemand ou en chanson) partagés au labo. Une journée au labo sans vous les filles, c'est triste, vous avez qui j'ai partagé mon bureau toutes ces années. J'aimerais aussi remercier, Florent, alias « choubidou », et notre petite Susanna pour leur bonne humeur. Merci aussi à Fatah et Jamil pour tous les échanges scientifiques. Un remerciement particulier pour Jérémie, qui a su rapidement intégrer les techniques du projet EHD3, et qui a permis une bonne progression de ce projet.

Je tiens à adresser des remerciements à tous les gens que j'ai côtoyés au cours de mes travaux à L'Institut Cochin et à l'Institut Curie. Tout d'abord, la plateforme d'imagerie : Vincent, Ludovic et François. Je souhaiterais, en particulier, remercier Lucie, qui a passé énormément de temps avec moi afin d'optimiser les réglages des études de microscopie. Aussi, j'aimerais remercier Jean Salamero, et Jérôme Boulanger pour leur collaboration ; Jean spécialement pour le temps qu'il nous a accordé afin d'analyser nos données et orienter le projet ; Jérôme pour tout le temps passé à développer les algorithmes d'analyses nécessaires pour mes travaux. Ce fut un plaisir de pouvoir travailler avec quelqu'un qui retranscrit aussi fidèlement

les questions biologiques mais qui fait également preuve d'une si bonne humeur. Merci aussi à Aurore Berthier et Ahmed El-Marjou, pour leurs précieux conseils pour toutes les manipulations de production et purification de protéines.

Enfin, j'aimerais clôturer mes remerciements en les adressant à tout ceux qui m'ont soutenu tout au long de ces années de thèse. Un énorme merci à mes parents qui m'ont toujours poussés vers l'avant, soutenus et permis d'en arriver là. Ce travail de thèse vous est en très grande partie dédié. Merci de m'avoir supporté pendant ma période de rédaction (je n'aurais pas aimé être à votre place par moment). Un énorme merci, à toi Jean-Christophe, qui a supporté ça tous les jours... avec mes moments d'excitation, de doute, de faiblesse et de grande satisfaction. Enfin, j'aimerais remercier tous mes amis qui m'ont toujours soutenu : JP, Airone, Jérémy, Nico, Lorenzo, Denis, Rodolphe... pour la partie parisienne ; Juju, Pasquale et John pour la partie liégeoise ! Merci les copains !!!

RESUME

Le recyclage de récepteurs et de lipides vers la membrane plasmique, est un processus finement régulé, essentiel pour l'homéostasie de la membrane plasmique et pour la migration cellulaire. Il requière l'intervention des petites GTPases de la famille Rabs et leurs effecteurs. La protéine MICAL-L1, effecteur de plusieurs Rabs, comme Rab 8, 11, 13 et 35, a été impliquée dans le recyclage vers la membrane plasmique. Dans cette étude, nous avons identifié une nouvelle interaction entre MICAL-L1 et la PACSINE3, une protéine à domaine F-BAR capable de façonner les membranes intracellulaires et qui contribue à la génération d'endosomes de recyclage tubulaires. MICAL-L1 est nécessaire pour la localisation de la PACSINE3 au niveau des membranes des endosomes. La perturbation du complexe MICAL-L1/PACSINE3 affecte le recyclage du récepteur de la transferrine (TfR) vers la membrane plasmique. Le complexe MICAL-L1/PACSINE3 est associé à des longs tubules membranaires contenant la transferrine comme cargo. La dynamique de ségrégation et de détachement des cargos Tf à partir des tubules contenant MICAL-L1 et PACSINE3, suggère que ce complexe contrôle le tri/adressage des endosomes de recyclage vers la membrane plasmique. Notre travail révèle un nouveau mécanisme de régulation de la voie de recyclage vers la surface cellulaire.

ABSTRACT

The recycling to the plasma membrane of receptors and lipids is tightly regulated and is essential for PM homeostasis, adhesion and cell migration. It requires small GTPase Rab proteins and their effectors. The MICAL-L1 protein, an effector of several Rabs including Rab 8, 11, 13 and 35, has been shown to play an important role in the recycling. Here, we report a novel interaction between MICAL-L1 and the BAR domain containing protein PACSIN3/Syndapin3 that contributes to generate tubular recycling endosomes. MICAL-L1 is required for the localization of PACSIN3 to endosomal membranes. Importantly, disruption of MICAL-L1/PACSIN3 interaction promotes the transferrin receptor (TfR) delivery back to the plasma membrane. The MICAL-L1/PACSIN3 complex accumulates in elongated tubules that contain transferrin carriers. The dynamic of transferrin positive endosomes segregation from MICAL-L1/PACSIN3 tubules suggests that MICAL-L1/PACSIN3 complex controls TfR recycling endosomes delivery to the plasma membrane. Our data provide novel mechanistic insights on the dynamical regulation of the plasma membrane recycling pathway.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES	7
INTRODUCTION :	10
1) L'endocytose	10
a) Première observation d'un phénomène d'endocytose.....	10
b) L'endocytose sous toutes ses formes.....	11
i) 1931, découverte de la pinocytose par Warren Lewis	11
ii) Les années 1950, découverte des cavéoles	11
iii) Les puits recouverts de clathrine	12
c) Classification actuelle des voies d'endocytose	12
d) L'endocytose dépendante de la clathrine	13
i) Première observation des manteaux de clathrine	14
ii) La clathrine, clé de voûte de l'endocytose dépendante de la clathrine	14
iii) Nucléation des vésicules recouvertes de clathrine.....	16
iv) Les complexes hétérotétramériques	18
v) Assemblage du manteau de clathrine	21
vi) La sélection de cargo par le complexe AP-2	24
vii) Fission du puits de clathrine et formation d'une vésicule mantelée de clathrine.	25
viii) Désassemblage du manteau de clathrine.....	27
e) L'endocytose indépendante de la clathrine.	30
i) Les cavéoles	30
ii) La voie de la flotilline	34
iii) La voie d'endocytose du récepteur à l'interleukine 2 (IL-2R).....	35
iv) La voie CLIC/GEEC.....	36
v) La voie Arf6-dépendante	37
vi) La voie FEME	38
vii) Phagocytose et macropinocytose.....	39
f) Endocytose : Que reste-t-il à découvrir ?	41
2) Trafic vésiculaire et adressage.....	42

a)	Petites GTPases, la superfamille Ras	43
i)	Vue d'ensemble.....	43
ii)	Cycle d'activation des petites GTPases	45
iii)	Principales fonctions des petites GTPases	47
b)	Rabs et trafic vésiculaire :.....	47
i)	Les protéines Rabs	48
ii)	Les SNAREs.....	52
iii)	Facteurs d'attache	53
c)	Endosomes précoces, plateformes de tri et de signalisation.....	56
d)	La voie de dégradation	58
i)	Les complexes ESCRT	59
ii)	Conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs	61
iii)	Maturation des endosomes tardifs.....	61
e)	Le transport rétrograde	64
i)	Le transport des CI-MPRs.....	64
ii)	Le transport des toxines bactériennes.....	65
iii)	Le rétromère	66
3)	Les voies de recyclage.....	69
a)	La voie de recyclage rapide.....	71
b)	La voie de recyclage lent.....	72
i)	Des endosomes de tri vers l'ERC	72
ii)	De l'ERC vers la membrane plasmique.....	73
iii)	Recyclage dépendant du rétromère	76
c)	Recyclage et fonctions cellulaires.....	78
i)	Recyclage et cytocinèse.....	78
ii)	Recyclage et adhérence cellulaire.....	79
iii)	Recyclage et fusion cellulaire	81
iv)	Recyclage et potentialisation à long terme.....	82
v)	Recyclage et polarisation cellulaire	83
vi)	Recyclage et métabolisme	86
vii)	Machineries de recyclage et pathologies.....	86
4)	Les protéines MICALs, une nouvelle famille impliquée dans l'endocytose	87
a)	La famille de protéines MICALs.....	87
b)	Les différents domaines des protéines MICALs et MICAL-Ls :	89

i) Domaine monooxygénase.....	89
ii) Domaine calponin homology	90
iii) Domaine LIM	90
iv) Région riche en proline.....	91
v) Domaine en superhélices (« coiled-coil »)	91
c) Protéines MICALs, trafic membranaire et cytosquelette d'actine.	91
i) MICAL3 et fusion des vésicules d'exocytose	91
ii) MICAL et croissance du cône axonal.....	92
d) Rôles des protéines MICAL-Ls dans le trafic membranaire	93
i) MICAL-L2 et recyclage membranaire.....	93
ii) MICAL-L1 et la dégradation de l'EGFR.....	97
iii) Partenaires de MICAL-L1	97
iv) MICAL-L1 et croissance des neurites.....	98
v) MICAL-L1 et mitose.....	100
5) Les PACSINEs et EHDs, effecteurs de MICAL-L1 et leur implication dans les déformations membranaires	101
a) Les PACSINEs	101
i) Les protéines à domaine BAR.....	103
ii) Fonctions de la PACSINE3	106
b) Les protéines EHDs.....	106
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....	111
RESULTATS.....	113
1) Résumé des principaux résultats soumis à publication.....	113
a) Interaction de MICAL-L1 et PACSINE3	113
b) MICAL-L1 et PACSINE3 colocalisent dans des compartiments de recyclage 114	
c) MICAL-L1 et PACSINE3 s'associent avec l'acide phosphatidique.	115
d) MICAL-L1 et PACSINE3 stimulent le recyclage du TfR	116
e) Les extinctions des protéines MICAL-L1 et PACSINE3 inhibent le recyclage 117	
f) La PACSINE3 stimule la formation des tubules contenant MICAL-L1	118
2) Article soumis à publication	123
3) EHD3, un autre partenaire de MICAL-L1 dans le recyclage membranaire ...	171
a) Caractérisation de l'interaction MICAL-L1/EHD3.....	171

b) MICAL-L1 et EHD3 colocalisent dans des structures tubulaires.	172
c) Le domaine NPF2 de MICAL-L1 est important pour la fission des tubules	173
d) L'interaction de MICAL-L1 avec les EHDs régule le recyclage du TfR.....	175
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	178
1) MICAL-L1/PACSINs/EHDs : de nouveaux complexes impliqués dans le recyclage	178
2) Les tubules membranaires seraient le site de tri/recyclage	180
3) Importance des domaines NPFs de MICAL-L1	181
4) EHDs, modification post-traductionnelles.....	182
5) Conclusion générale.....	183
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	185

LISTE DES ABREVIATIONS

AP : Adaptator protein
Arf : ADP-ribosylation factor
BAR : Bin/Amphiphysin/Rvs
CCP : Clathrin coated pit
CCV : Clathrin coated vesicle
CI-MPR : Cation-independent mannose 6-phosphate receptor
EEA1 : Early endosome antigen 1
EGF : Epidermal growth factor
EGFR : Epidermal growth factor receptor
EH : Epsin homology
EHD : Eps15 homology domain-containing protein
F-actine : Actine filamenteuse
F-BAR : Fer-CIP4 homology-BAR
GAP : GTPase activating protein
GDI : GDP dissociation inhibitor
GDF : GDI displacement factor
GDP : Guanosine diphosphate
GEF : Guanine nucleotide exchange factor
GTP : Guanosine triphosphate
IL2R β : Sous-unité β du récepteur à l'interleukine 2.
ILV : Intraluminal vesicle
Lamp1 : Lysosome associated protein 1
MICAL : Molecule interacting with CasL
MICAL-L : Molecule interactinf with CasL-Like
MVB : Multivesicular bodies
(N-)WASP : (neuronal) Wiskott-Aldrich syndrome protein
NPF : Nucleation promoting factor
PA : Phosphatidic Acid
PACSINE : Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons
PH : Pleckstrin Homology
PI(4,5)P₂ : Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate

PI(4)P : Phosphatidylinoditol 4 phosphate

PRD : Proline-rich domain

PS : Phosphatidylsérine

SH3 : Src homology 3

SNX : Sorting nexin

Tf : Transferrine

TfR : Transferrin receptor

TGN : *trans*-Golgi network

TIRF : Total internal reflection fluorescence

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Élie Metchnikoff et ses dessins de phagocytose bactérienne par des macrophages et des microphages.....	11
Figure 2 :	Différentes structures décrites comme étant impliquées dans des événements d'endocytose.....	13
Figure 3 :	Observation de puits et vésicules recouverts de clathrine.....	14
Figure 4 :	Triskèle de clathrine.....	15
Figure 5 :	Assemblage de molécules de clathrine.....	15
Figure 6 :	Schémas représentant les deux hypothèses d'initiation de l'endocytose.....	17
Figure 7 :	Localisation intracellulaire des différents complexes APs.....	19
Figure 8 :	Composition des complexes APs.....	19
Figure 9 :	Modèle d'insertion du domaine ENTH dans le feuillet cytoplasmique membranaire.....	23
Figure 10 :	Organisation des domaines des isoformes courte et longue de l'intersectine.....	24
Figure 11 :	Organisation schématique de la dynamine et de ses interactions avec les protéines à domaine BAR.....	25
Figure 12 :	Schéma d'action de la dynamine.....	26
Figure 13 :	Séquence de recrutement protéique nécessaire à la formation d'une vésicule recouverte de clathrine.....	27
Figure 14 :	Exemple de désassemblage d'une cage de clathrine par les protéines auxiline et Hsc70.....	29
Figure 15 :	Diversité des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine.....	30
Figure 16 :	Assemblage des cavéoles.....	31
Figure 17 :	EHD2 et PACSINE2 sont associées aux cavéoles.....	33
Figure 18 :	Ultrastructure des invaginations membranaires induites par la flotilline.....	34
Figure 19 :	Acteurs de la voie d'endocytose de l'IL-2R β	36
Figure 20 :	Vue d'ensemble des voies de phagocytose et de macropinocytose.....	40
Figure 21 :	Structure d'une onde dorsale circulaire.....	41
Figure 22 :	Cinétique d'interaction entre le PI(4,5)P2 et les protéines accessoires impliquées dans l'endocytose dépendant de la clathrine.....	42
Figure 23 :	Arbre phylogénétique de la superfamille Ras.....	44
Figure 24 :	Domaines conservés chez les protéines de la superfamille Ras. (modèle de présentation : Ras).....	44
Figure 25 :	Mécanisme d'échange de nucléotide induit par un GEF.....	45
Figure 26 :	Cycle d'activation des petites GTPases.....	46
Figure 27 :	Vue d'ensemble du trafic vésiculaire dans une cellule de mammifère.....	48
Figure 28 :	Présentation globale de l'implication des Rabs dans l'identité des compartiments membranaires et dans le trafic intracellulaire (représentation d'une cellule épithéliale).....	50
Figure 29 :	Schéma d'activation en cascade des Rabs.....	51
Figure 30 :	Organisation des domaines des différentes protéines SNAREs.....	52
Figure 31 :	Mécanisme d'action des SNAREs.....	53
Figure 32 :	Vue globale des MTCs.....	54
Figure 33 :	Résumé général du trafic vésiculaire d'un compartiment donneur à son compartiment cible.....	55
Figure 34 :	Structure des endosomes précoces.....	57
Figure 35 :	Tri et adressage sélectif de cargos.....	58
Figure 36 :	Formation des ILVs.....	60
Figure 37 :	Composition et spécificité des complexes CORVET et HOPS.....	62
Figure 38 :	Endocytose du récepteur à l'EGF.....	64
Figure 39 :	Différentes voies de transport rétrograde.....	66
Figure 40 :	Cinétique de recrutement du rétromère.....	67
Figure 41 :	Modèle proposé de tubulation/scission par le rétromère.....	68
Figure 42 :	Fonctions des voies de recyclage.....	70
Figure 43 :	Vue globale des voies classiques de recyclage.....	76
Figure 44 :	Recyclage du DMT1-II à la membrane plasmique via le TGN.....	77
Figure 45 :	Réorganisation des endosomes de recyclage au cours des étapes finales de la cytocinèse.....	79
Figure 46 :	Voies de recyclages impliquées dans les contacts intercellulaires et l'adhérence à la matrice extracellulaire.....	81
Figure 47 :	Vue d'ensemble du rôle de la machinerie de recyclage dans la potentialisation à long terme.....	83
Figure 48 :	Trafic intracellulaire dans une cellule polarisée.....	85
Figure 49 :	Organisation des protéines MICALs humaines et de drosophile.....	88
Figure 50 :	Organisation des protéines MICAL-Ls.....	89
Figure 51 :	Schéma d'action de Mical-SelR dans la rétraction du cône axonal.....	93
Figure 52 :	MICAL-L2 est localisée le long des filaments d'actine.....	94
Figure 53 :	MICAL-L2 dans le recyclage des molécules d'adhésion.....	95
Figure 54 :	MICAL-L2 dans la signalisation du récepteur à l'insuline dans les cellules musculaires.....	96
Figure 55 :	Colocalisation de l'EGFR dans les compartiments Rab7-MICAL-L1.....	97
Figure 56 :	Recrutement de MICAL-L1 par Rab35 au niveau des compartiments Arf6 et cascade de signalisation.....	99
Figure 57 :	Colocalisation des protéines EHD1 et MICAL-L1 au niveau du site d'abscission.....	100
Figure 58 :	Organisation des PACSINEs et interactions connues.....	102
Figure 59 :	Modes de déformation des membranes.....	104
Figure 60 :	Vue globale des protéines et domaines induisant des déformations membranaires dans la cellule.....	105
Figure 61 :	Fonctions des protéines EHDs dans le transport intracellulaire.....	109
Figure 62 :	MICAL-L1 et PACSINE3 interagissent dans la cellule.....	113
Figure 63 :	Deux motifs PxxP de MICAL-L1 sont nécessaires et suffisants pour l'interaction avec le domaine SH3 de la PACSINE3.....	114
Figure 64 :	MICAL-L1 et PACSINE3 colocalisent dans des structures vésiculo-tubulaires.....	115
Figure 65 :	MICAL-L1 et PACSINE3 stimulent le recyclage du TfR.....	116
Figure 66 :	L'extinction de MICAL-L1 ou PACSINE3 inhibe le recyclage du TfR.....	118
Figure 67 :	PACSINE3 augmente le nombre et la taille des tubules formés par MICAL-L1.....	119

Figure 68 :	L'extinction de PACSINE3 n'affecte pas les tubules formés par MICAL-L1.....	120
Figure 69 :	MICAL-L1 délocalise la PACSINE3.....	121
Figure 70 :	Le motif NPF1 de MICAL-L1 est nécessaire à l'interaction avec EHD3.....	172
Figure 71 :	EHD3 colocalise avec MICAL-L1 et stimule la formation de tubules.	173
Figure 72 :	L'absence du motif NPF2 de MICAL-L1 génère la formation de longs tubules.....	174
Figure 73 :	Les deux motifs NPF de MICAL-L1 sont importants pour le recyclage du TfR.....	176

INTRODUCTION

INTRODUCTION :

1) L'endocytose

a) Première observation d'un phénomène d'endocytose

À la fin du XIXème siècle, un large débat anime la communauté scientifique. En effet de nombreux physiologistes se demandent comment un organisme peut se défendre contre des corps étrangers. Ce débat oppose deux principales écoles : les « cellularistes » (principalement français) et les « humoralistes » (majoritairement allemands). C'est le zoologiste russe Élie Metchnikoff qui, en 1882, apporta de nouveaux éléments de réponse. En effet, il travaillait à cette époque sur des larves d'étoile de mer (totalement transparentes et donc très faciles à visualiser sous un microscope) et se demanda comment ces larves réagiraient pour se défendre en présence d'un corps étranger. Il va alors simplement introduire des épines de rosiers dans la peau des larves d'étoile de mer et constater la mobilisation de cellules au contact des épines pour les digérer: c'est la phagocytose (du grec *phagos* et *phagein* signifiant respectivement glouton et manger). Metchnikoff mit alors en évidence un processus de défense immunitaire et donna avantage aux « cellularistes » quant à la question du système de défense des organismes face à des corps étrangers. Deux ans plus tard, en 1890, les anticorps furent mis en évidence à l'Institut Koch en Allemagne dans la protection contre le tétanos. Cette découverte démontra l'existence d'une substance soluble dans le sang assurant l'immunité : les organismes possèdent donc deux moyens pour lutter contre les agressions extérieures. « Cellularistes » et « humoralistes » détenaient chacun une part de vérité. Les découvertes d'Élie Metchnikoff et Paul Ehrlich furent récompensées en 1908 par un prix Nobel commun pour leurs travaux sur l'immunité.

Du point de vue du biologiste cellulaire, les travaux de Metchnikoff sont les premières observations d'un processus d'endocytose, c'est à dire de mécanisme de transport de particules ou molécules vers l'intérieur de la cellule. En plus de sa découverte majeure en immunologie, Metchnikoff a donc aussi été le premier à rapporter la capacité des cellules à introduire dans leur corps des particules venant de l'extérieur.

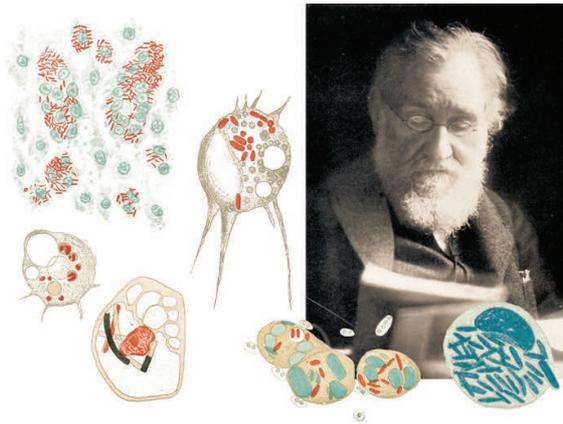


Figure 1 : Élie Metchnikoff et ses dessins de phagocytose bactérienne par des macrophages et des microphages.

Adapté de (Kaufmann, 2008).

b) L'endocytose sous toutes ses formes

Suite à la découverte de Metchnikoff, d'autres voies d'endocytose furent caractérisées

i) 1931, découverte de la pinocytose par Warren Lewis

C'est en réalisant des films de macrophages en culture que Warren Lewis fit en 1931 l'observation suivante : les macrophages engloutissaient de façon discontinue de la phase fluide, via leurs extensions membranaires ou pseudopodes. Ces derniers rabattaient de la phase fluide vers la membrane cellulaire formant ainsi des vésicules en forme de gouttelettes. Elles sont ensuite internalisées et se détachent de la membrane plasmique formant des vésicules d'environ 1 à 2 microns de diamètre. Au fur et à mesure qu'elles migrent en direction de la région périnucléaire, ces vésicules rétrécissent en taille, et sont digérées. Ce phénomène fut baptisé par Warren Lewis la pinocytose, venant du grec *pinô* signifiant « je bois ». Cette appellation fut donnée en référence à la découverte de la phagocytose, dans laquelle la cellule « mange » des particules solides. Dans le cas de la pinocytose, le matériel ingéré est liquide.

ii) Les années 1950, découverte des cavéoles

En 1953, George Palade identifia - par microscopie électronique - des structures en forme d'oméga inversé présentes au niveau de la membrane plasmique des cellules,

les cavéoles. La structure des cavéoles est, de nos jours, mieux caractérisée mais leurs fonctions restent encore débattues (et sera discutée dans la suite du manuscrit).

iii) Les puits recouverts de clathrine

Thomas Roth et Keith Porter furent deux hommes importants dans le domaine de l'endocytose. Dans les années 1960 ils travaillaient tous deux sur l'accumulation du vitellus dans les oocytes de moustique. En effet, le vitellus (qui est produit dans d'autres parties de l'organisme de la femelle moustique) contient des protéines de haut poids moléculaire qui parviennent à pénétrer dans l'oocyte. C'est en se demandant comment cela pouvait se produire qu'ils remarquèrent que pendant l'accumulation du vitellus dans l'oocyte, une augmentation des invaginations de la membrane plasmique avait aussi lieu. Ils suggérèrent alors que les protéines du vitellus étaient spécifiquement adsorbées à la membrane externe des cellules qui forme, ensuite, une invagination de laquelle découlera la formation d'une vésicule intracellulaire tapissée d'un manteau. Ce n'est qu'une dizaine d'années après que Barbara Pearse caractérisa ce manteau en identifiant la protéine majeure qui le compose : la clathrine. (Pearse, 1975; Pearse, 1976)

c) Classification actuelle des voies d'endocytose

Voici maintenant plus d'un siècle que l'endocytose est décrite et de plus en plus finement caractérisée. Tous les travaux de recherche menés jusqu'ici permettent de déterminer la classification suivante : L'endocytose dépendante de la clathrine et l'endocytose indépendante de la clathrine regroupant les cavéoles, l'endocytose de type CLIC/GEEC, la macropinocytose, la phagocytose, l'endocytose dépendante de la flotilline ou d'Arf6, la voie d'endocytose de la sous-unité β du récepteur à l'IL2 ou encore comme décrite très récemment, la voie FEME (Figure 2).

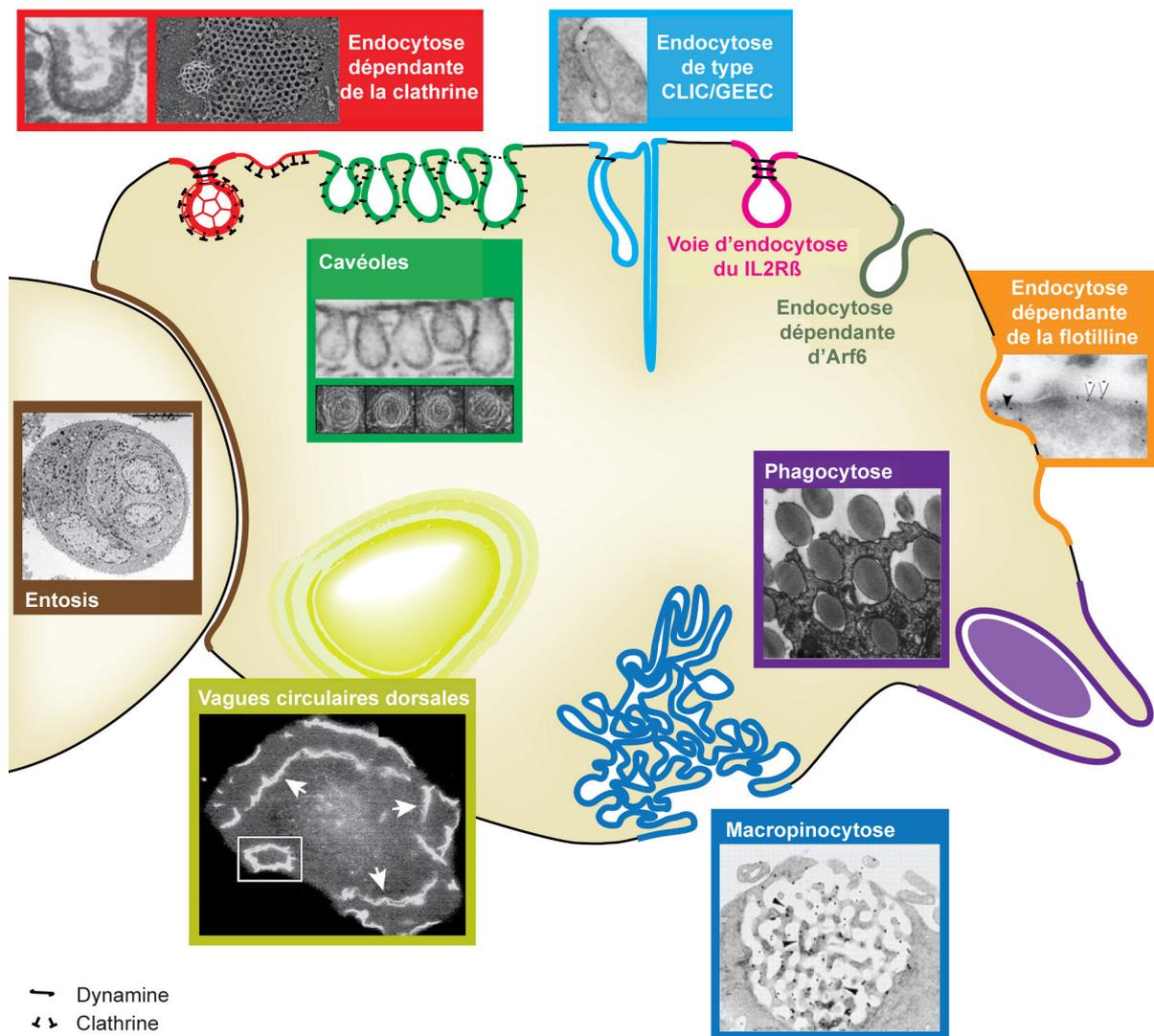


Figure 2 : Différentes structures décrites comme étant impliquées dans des évènements d'endocytose.

Panneaux : images de microscopie électronique (à transmission ou à balayage) ou à fluorescence. Adapté de (Doherty and McMahon, 2009).

d) L'endocytose dépendante de la clathrine

Elle est à l'heure actuelle la voie d'endocytose la mieux caractérisée. L'endocytose dépendante de la clathrine correspond à l'internalisation de molécules et récepteurs au niveau de la membrane plasmique de la cellule via des invaginations membranaires et la formation de vésicules mantelées de clathrine. Des vésicules recouvertes de clathrine peuvent être formées au niveau d'autres compartiments membranaires de la cellule, cependant le terme « endocytose dépendante de la clathrine » est restreint aux vésicules recouvertes de clathrine issues de la membrane plasmique.

i) Première observation des manteaux de clathrine

Des vésicules recouvertes de clathrine ont été observées pour la première fois en microscopie électronique dans des oocytes de moustique en 1964 par Thomas Roth et Keith Porter (Roth and Porter, 1964). Sur les images de microscopie électronique (Figure 3) il est donc possible d'observer un manteau protéique plus dense aux électrons qui se trouvent au niveau d'invaginations membranaires, les puits mantelés de clathrine (CCPs, clathrin coated pits), ou de vésicules entièrement recouvertes elles aussi (CCVs, clathrin coated vesicles).

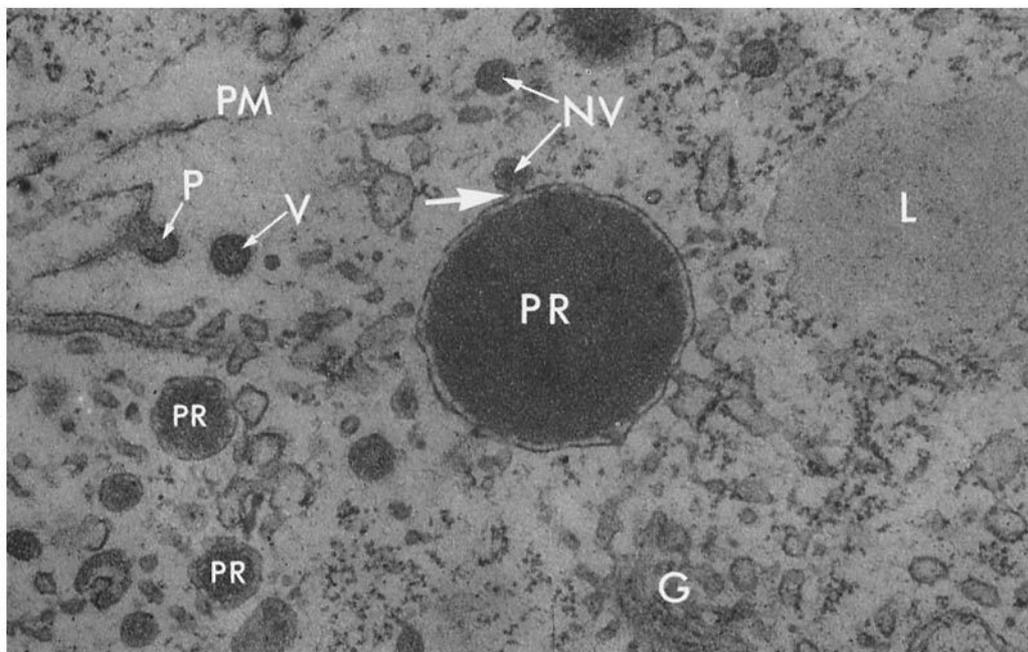


Figure 3 : Observation de puits et vésicules recouverts de clathrine.

Image de microscopie électronique (Grossissement X56500) du cortex d'un oocyte de moustique. Il est possible d'y observer la fusion d'une vésicule non recouverte (NV) avec la membrane de l'œuf (PR). Des puits (P) ainsi que des vésicules (V) recouverts sont observables à la membrane plasmique. On peut également noter la présence des composants de l'appareil de Golgi (G) et des corps lipidiques (L). Adapté de (Roth and Porter, 1964).

ii) La clathrine, clé de voûte de l'endocytose dépendante de la clathrine

La clathrine est une protéine hexamérique composée de 3 chaînes lourdes (190 kDa) et de 3 chaînes légères (30 kDa) qui une fois assemblées donne à la clathrine une organisation très caractéristique en triskèle (Figure 4). Ces chaînes légères empêchent l'auto-assemblage des chaînes lourdes à pH physiologique (Liu et al.,

1995; Ungewickell and Ungewickell, 1991; Ybe et al., 1998). Chez les mammifères, deux classes (A et B) de chaînes légères existent et chacune d'elles possède des formes épissées (Kirchhausen and Harrison, 1981; Ungewickell and Branton, 1981). Les triskèles de clathrine possèdent la capacité de s'auto-assembler, formant alors des cages vides en forme de « ballon de football » (avec en guise de « couture » les triskèles de clathrine) (Figure 5) (Kanaseki and Kadota, 1969).

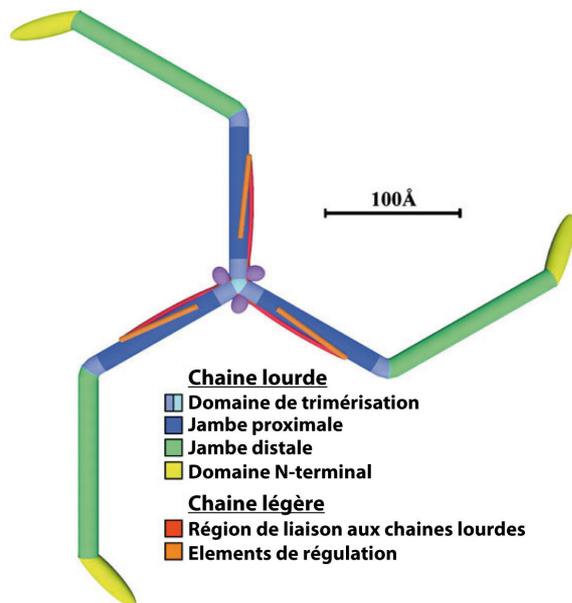


Figure 4 : Triskèle de clathrine.

Schéma représentant l'organisation des 6 sous-unités composant une molécule de clathrine. Adapté de (Chen et al., 2002).

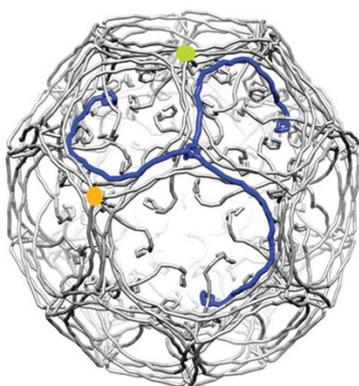


Figure 5 : Assemblage de molécules de clathrine.

Cage de clathrine composée de 36 triskèles. Adapté de (Kirchhausen et al., 2014).

Les triskèles peuvent s'assembler de différentes manières et donner des pentagones ou des hexagones, retrouvés à la surface des vésicules recouvertes ou à la surface des membranes biologiques (Fotin et al., 2004b; Fotin et al., 2006).

En ce qui concerne la chaîne lourde de la clathrine, elle possède une jambe proximale qui contient le domaine de liaison aux chaînes légères, une jambe distale et un domaine N-terminal capable de lier différentes protéines adaptatrices.

La clathrine purifiée s'assemble spontanément en cages, même en l'absence de chaînes légères (Crowther and Pearse, 1981; Keen et al., 1979; Ungewickell and Branton, 1981). À partir ces résultats, il a pu être démontré que l'inhibition de l'expression des chaînes légères de clathrine par ARN interférence sur une culture provenant de tissu, n'affecte pas l'endocytose (Chen and Brodsky, 2005; Poupon et al., 2008; Wang et al., 2006a; Wilbur et al., 2008). Ces résultats démontrent que les chaînes légères ont un rôle régulateur dans l'assemblage de la clathrine. Ce rôle a été mieux détaillé il y a quelques années dans une étude qui montre que les interactions électrostatiques contrôlent l'association des chaînes légères aux chaînes lourdes (Wilbur et al., 2010). Ceci favorise alors ou non l'assemblage des molécules de clathrine. Ces conclusions permettent également d'expliquer la sensibilité de l'assemblage de la clathrine au pH environnant.

Si la clathrine peut s'assembler en cage de façon spontanée in vitro, tel n'est pas le cas en conditions physiologiques. En effet son assemblage nécessite la présence d'autres facteurs, appelés protéines d'assemblage (Zaremba and Keen, 1983). Ces dernières sont les autres composants du manteau des puits et des vésicules et existent environ au nombre de vingt. Parmi elles figurent les complexes hétérotétramériques adaptateurs, APs (AP-2 dans le cas de l'endocytose dépendante de la clathrine), l'epsine, la sorting nexin 9 (SNX9) ou encore l'amphiphysine.

iii) Nucléation des vésicules recouvertes de clathrine

La première étape de la formation d'une vésicule recouverte de clathrine est l'invagination de la membrane, formant un puits. Il a été proposé pendant longtemps que l'initiation de la formation de ce puits se faisait via le recrutement du complexe AP-2 au niveau de la membrane plasmique. Mais ces dernières années, des études faites chez la levure et dans des cellules de mammifères semblent montrer qu'un

module de nucléation se forme au niveau de la membrane plasmique, par interaction avec le PI(4,5)P₂ et déterminerait alors le site où la clathrine est recrutée, permettant ensuite la bourgeonnement d'une vésicule. Ce module de nucléation inclurait les protéines FCHo (FCH domains only) et Eps15 (EGFR pathway substrate 15) (Henne et al., 2010; Reider et al., 2009; Stimpson et al., 2009) et semble nécessaire pour la formation des CCPs. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que l'extinction de FCHo ou d'Eps15 inhibe le recrutement du manteau de clathrine. De plus la protéine FCHo possède un domaine F-BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) capable de lier et déformer les membranes ayant une faible courbure. Ceci laisse supposer que la génération d'une courbure membranaire précéderait le recrutement de la clathrine. Cependant une étude récente de l'équipe de Tom Kirchhausen a revisité cette hypothèse et a conclu que le complexe AP-2 arrive le premier sur le site d'endocytose, permettant ensuite le recrutement de la clathrine et d'autres protéines accessoires (Cocucci et al., 2012). Une autre étude, faite chez le poisson zèbre, soutient indirectement cette hypothèse. Elle met en effet en avant un rôle plus spécifique de la protéine FCHo1 dans l'endocytose spécifique de récepteurs, plutôt qu'un rôle de nucléateur global de puits de clathrine (Umasankar et al., 2012). À l'heure actuelle il n'est donc pas possible de connaître la cinétique du nucléation des CCPs (Figure 6).

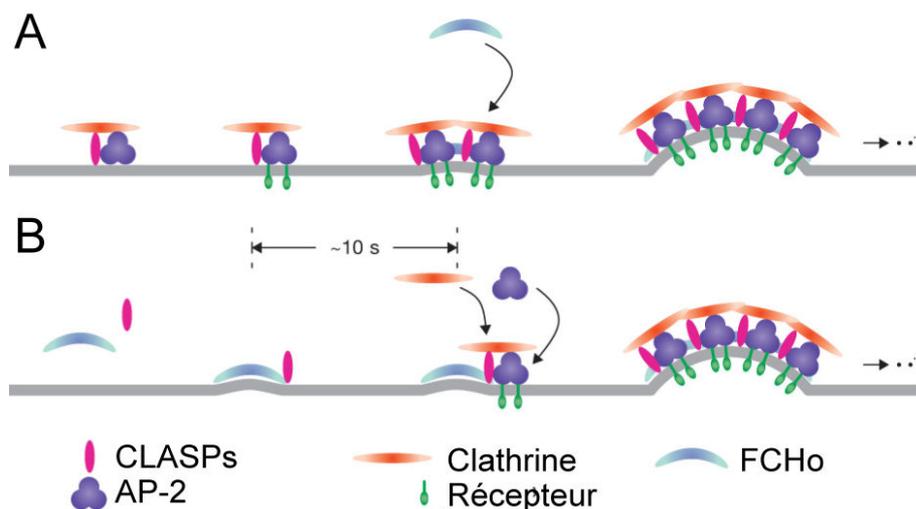


Figure 6 : Schémas représentant les deux hypothèses d'initiation de l'endocytose.

(A) AP-2 est recrutée à la membrane plasmique le premier, recrutant ensuite, clathrine et protéines accessoires qui vont courber la membrane et initier la formation du puits. (B) FCHo arrive la première sur le site d'endocytose, lie et courbe la membrane. Cette courbure permet alors le recrutement du complexe AP-2 et des autres protéines accessoires qui vont participer à la formation du puits. Adapté de (Merrifield, 2012).

iv) Les complexes hétérotétramériques

Les complexes APs ont une place très importante dans l'adressage de cargos protéiques. Ils en assurent le recrutement et la concentration dans des vésicules qui sont ensuite prises en charge par les machineries de trafic vésiculaire et transportées vers leur compartiment cible. Ceci s'effectue par la reconnaissance des signaux spécifiques présents dans la queue cytoplasmique des protéines à transporter, ce qui permet ensuite le recrutement de la clathrine et des protéines associées.

Jusqu'à présent 5 complexes AP ont été identifiés (AP-1, AP-2, AP-3, AP-4 et AP-5) (Figure 7), chacun composé de deux grandes sous-unités ($\gamma/\alpha/\delta/\epsilon/\zeta$ et β 1 à 5, respectivement), une sous-unité de taille moyenne (μ 1 à 5) et une petite sous-unité (σ 1 à 5) (Figure 8). Chacune de ces sous-unités possède une ou plusieurs activités propres. Par exemple les sous-unités β des complexes AP-1 et AP-2 interagissent avec le domaine N-terminal de la chaîne lourde de la clathrine. Cette interaction a lieu au niveau de motifs spécifiques appelés « clathrin box » qui permettent la formation du manteau de clathrine (Dell'Angelica et al., 1998). Cependant des travaux très récents de résonance magnétique nucléaire indiquent que deux autres séquences présentes sur la chaîne lourde de la clathrine peuvent être reconnues par les motifs « clathrin box » présents sur les complexes APs (Zhuo et al., 2015). Les sous-unités μ interagissent avec des motifs hydrophobes contenant notamment des tyrosines. Les sous-unités α 2 et γ 1 interagissent avec les lipides composant les membranes mais également avec des motifs dileucines (LL). Bien qu'elles interagissent avec des motifs dileucines, le rôle des sous-unités σ des complexes AP-1 et AP-2 n'est pas clairement déterminé. Il est à noter que certaines de ces sous-unités existent sous plusieurs isoformes codées par différents gènes. Par exemple, AP-2 possède 2 isoformes de sa sous-unité α , α A et α C. L'existence de ces différentes isoformes permet l'obtention de différentes combinaisons d'association des sous-unités des complexes hétérotétramériques et permet des expressions et fonctions spécifiques dans différents tissus (Farias et al., 2012; Folsch et al., 1999; Folsch et al., 2003; Gravotta et al., 2012; Guo et al., 2013; Mattera et al., 2011).

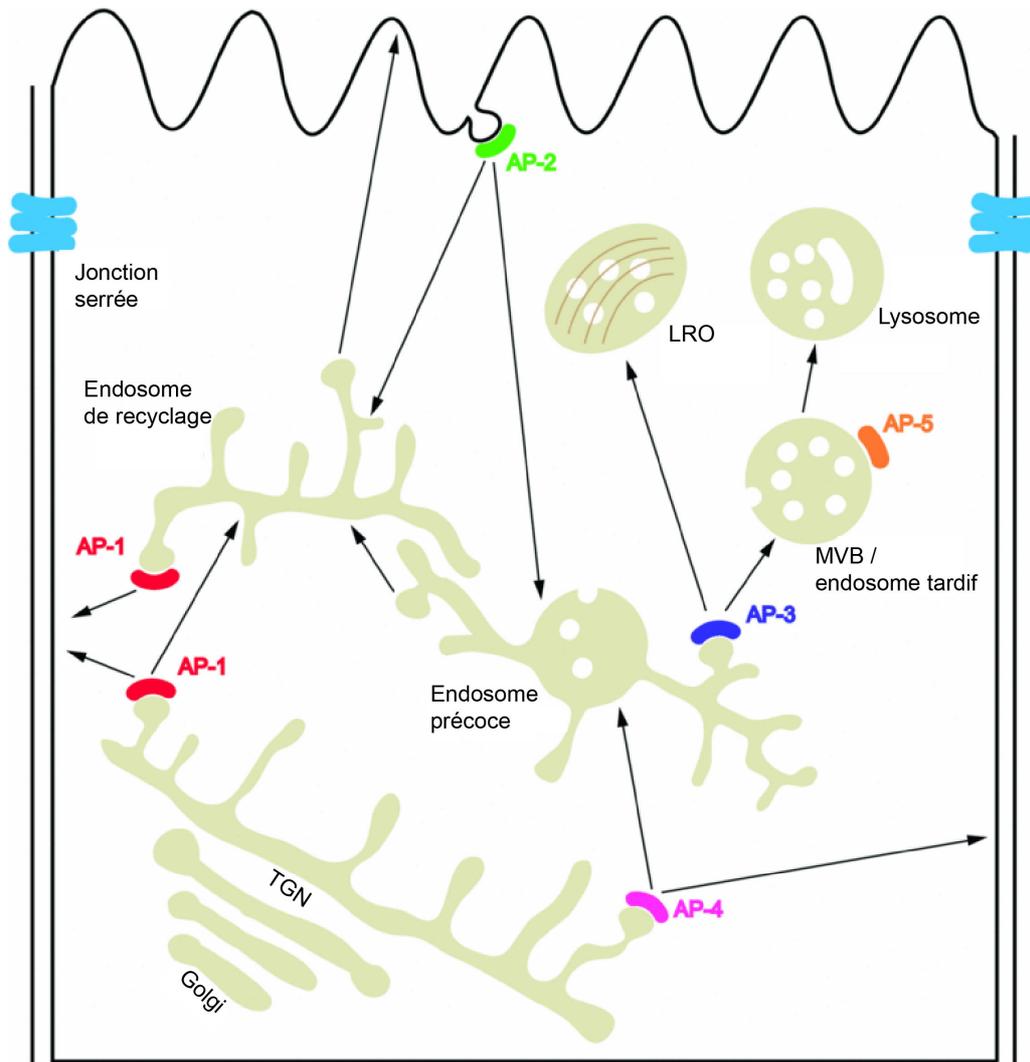


Figure 7 : Localisation intracellulaire des différents complexes APs.

AP-1 est localisé au niveau du TGN et des endosomes de recyclage et régule le transport bidirectionnel entre eux. Dans les cellules épithéliales polarisées le complexe AP-1 régule également l'adressage basolatéral. AP-2 joue un rôle dans l'endocytose clathrine dépendante au niveau de la membrane plasmique. AP-3 est localisé au niveau des endosomes et est impliqué dans la biogenèse des LROs. AP-4 est présent au niveau du TGN, et régule le trafic vésiculaire vers les endosomes ou la membrane plasmique basolatérale. AP-5 est localisé au niveau des endosomes tardifs et sa fonction n'est pas encore clairement identifiée. Adapté de (Park and Guo, 2014)

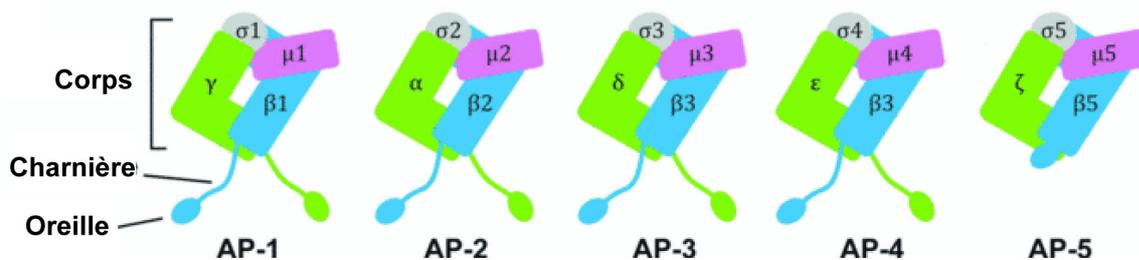


Figure 8 : Composition des complexes APs.

Tous les complexes APs sont composés d'un corps, d'une région charnière (sauf AP-5) et de domaines globulaires ou oreilles. Le corps est responsable de la reconnaissance du cargo et

de la localisation membranaire. La région charnière et les oreilles jouent un rôle important dans l'interaction avec les manteaux protéiques et les protéines accessoires/régulatrices. Adapté de (Park and Guo, 2014).

Dans le cas de l'endocytose dépendante de la clathrine, le complexe hétérotétramérique impliqué est AP-2 (Ahle et al., 1988; Robinson and Pearse, 1986). AP-2 permet l'endocytose de récepteurs et molécules d'adhésion, mais également de protéines virales (Holloway et al., 2013; Huang et al., 2012; Kamiguchi et al., 1998; Mason et al., 2008; Mattera et al., 2011; Park and Guo, 2014; Rappoport and Simon, 2009; Traub, 2009). Le recrutement du complexe AP-2 au niveau de la membrane plasmique se fait via les interactions de ses sous-unités α and $\mu 2$ avec le PI(4,5)P₂ (phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate) (Gaidarov and Keen, 1999; Jackson et al., 2010). La protéine Arf6 (ADP-ribosylation factor 6) pourrait également être impliquée dans le recrutement d'AP-2 à la membrane plasmique (Paleotti et al., 2005).

Le complexe AP-1 est localisé au niveau du TGN et des endosomes ; celui-ci interagit directement avec la protéine Arf1 et le PI(4)P (phosphatidylinositol 4 phosphate) (Ren et al., 2013; Wang et al., 2003; Zhu et al., 1999). Les différents complexes AP-1A et AP-1B sont impliqués dans la biogenèse des vésicules sécrétoires et dans le transport bidirectionnel entre le TGN et les endosomes. Ils participent également à l'adressage spécifique de cargos, dans les cellules polarisées ; ils sont, par exemple, impliqués dans l'adressage de protéines au niveau de l'axone dans les neurones, ou de protéines de la membrane basolatérale dans les cellules épithéliales polarisées (Folsch et al., 1999; Folsch et al., 2003; Guo et al., 2013; Stamnes and Rothman, 1993; Wang et al., 2003).

Comme le complexe AP-1, les complexes AP-3 et AP-4 sont retrouvés au niveau du TGN et des endosomes ; leur recrutement membranaire est contrôlé par Arf1 (Boehm et al., 2001; Faundez et al., 1998; Ooi et al., 1998). AP-3 est préférentiellement retrouvé au niveau des compartiments endosomaux tubulaires ; il permet le transport des endosomes tubulaires vers les endosomes tardifs ainsi que la biogenèse de LRO (Lysosome-related organelles). Le complexe AP-3B, spécifique des cellules neuronales, a également été démontré comme étant impliqué dans le relargage d'organelles d'exocytose (Blumstein et al., 2001; Faundez and Kelly, 2000; Mullins et al., 2000; Scheuber et al., 2006; Voglmaier et al., 2006). AP-4 est quant à lui responsable du transport du TGN vers les endosomes sans intervention de la

clathrine. Mais il joue également un rôle dans l'adressage spécifique dans les cellules polarisées épithéliales et neuronales, tout comme AP-1 (Dell'Angelica et al., 1999; Matsuda et al., 2008; Simmen et al., 2002).

Enfin, très récemment, l'équipe de Margaret S. Robinson a identifié un cinquième complexe AP, impliqué dans le tri endosomal (Hirst et al., 2011). Ce complexe, AP-5, est retrouvé au niveau des endosomes tardifs et, comme AP-4, il n'est pas associé à la clathrine. En revanche ce complexe interagit avec les protéines SPG11 (spastic paraplegia type 11) et SPG15 (Hirst et al., 2013). Ces protéines, dont les prédictions de structures en α -solénoïdes, similaires à la chaîne lourde de la clathrine et COPI (coatamer protein complex I), sont de bonnes candidates pour l'échafaudage du complexe AP-5. Le recrutement d'AP-5 au niveau des membranes n'est toujours pas clair. Sa localisation n'est pas sensible à l'effet de la BFA (bréfeldine A) suggérant qu'il n'est pas recruté par Arf1 comme d'autres complexes hétérotétramériques. La seule hypothèse proposée serait que SPG15 faciliterait le recrutement d'AP-5 via son interaction avec le PI(3)P (phosphatidylinositol 3 phosphate).

v) Assemblage du manteau de clathrine

Une fois le puits initié, la clathrine va s'accumuler et recruter différentes protéines qui vont permettre la stabilisation du puits et ainsi son expansion jusqu'à quasi-fermeture de ce dernier. Un complexe AP-2 ne possédant pas d'oreilles ne recrute pas les protéines accessoires et aboutit à une très forte proportion de puits qui ne s'invaginent pas et deviennent abortifs (Aguet et al., 2013). Parmi ces protéines accessoires, on retrouve Eps15, l'epsine, FCHo, l'intersectine ou encore CALM. Nous allons maintenant nous intéresser plus en détails à chacune de ces familles de protéines.

Eps15 : La protéine Eps15 a été initialement caractérisée comme substrat de l'activité kinase du récepteur à l'EGF. Elle interagit constitutivement et directement avec AP-2 (Benmerah et al., 1995) et contient environ 15 sites de liaison aux oreilles de ce dernier. Eps15 est composée d'un domaine N-terminal comprenant 3 domaines EH (Eps15 homology), lesquels interagissent avec des motifs NPF (asparagine-proline-phénylalanine). La région centrale d'Eps15 est composée de répétitions formant des domaines en superhélices, responsable de

l'homodimérisation d'Eps15 (Tebar et al., 1996), voire même de son oligomérisation. Cette oligomérisation est facilitée grâce aux interactions entre Eps15 et FCHo (elle aussi présente sous forme dimérique). Enfin, en C-terminal Eps15 possède des séquences DPF (acide aspartique-proline-phénylalanine) qui se lient au complexe AP-2. L'inhibition d'Eps15 diminue de façon très importante l'endocytose des récepteurs à l'EGF et à la transferrine. Cette protéine a donc une place très importante dans l'endocytose au niveau de la concentration et de l'échafaudage des complexes AP-2. Elle a également d'autres rôles dans des processus autres que l'endocytose que je ne détaillerai pas ici.

Les epsines : cette famille de protéines recense 4 membres : epsine-1, epsine-2, epsine-3 et epsineR. L'epsine-1 a été découverte comme partenaire de la protéine Eps15 (Chen et al., 1998). L'epsine-2 fut découverte peu après (Rosenthal et al., 1999). Ces 2 epsines sont localisées au niveau de la membrane plasmique (Chen et al., 1998; Rosenthal et al., 1999). Elles sont exprimées de façon ubiquitaire mais présentent un enrichissement au niveau du cerveau. À l'inverse, l'epsine-3 (Spradling et al., 2001) possède un profil d'expression très restreint, incluant les kératinocytes, les cellules gastriques pariétales et certains carcinomes (Coon et al., 2011; Ko et al., 2010; Wang et al., 2006b). En plus de ces epsines classiques localisées à la membrane plasmique, il existe des protéines epsine-like comme epsineR. EpsineR a des partenaires protéiques et lipidiques différents de ceux des epsines et est localisée au niveau du TGN et des endosomes. Elle participe au transport des endosomes vers le Golgi (Duncan et al., 2003; Hirst et al., 2003; Kalthoff et al., 2002; Mills et al., 2003; Wasiak et al., 2002).

Toutes les epsines possèdent un domaine caractéristique, appelé ENTH (epsin N-terminal homology domain), qui se lie au PI(4,5)P₂ et s'insère dans le feuillet cytoplasmique des membranes (plasmique et des compartiments d'endocytose) (Figure 9). Cette propriété du domaine ENTH induit une courbure de la membrane, favorisant ainsi la formation des invaginations membranaires (formation des CCPs ou même des CCVs) (Ford et al., 2002; Itoh et al., 2001; Nossal and Zimmerberg, 2002).

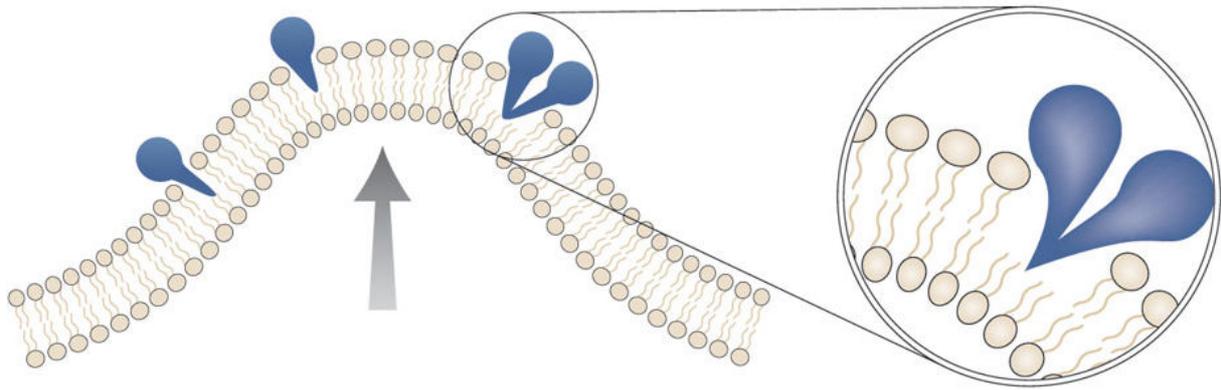


Figure 9 : Modèle d'insertion du domaine ENTH dans le feuillet cytoplasmique membranaire.

La courbure membranaire est causée par une forte densité locale d'hélices amphipathiques insérées de façon asymétrique dans la bicouche lipidique. Adapté de (Kirchhausen, 2012).

CALM/AP180 : CALM (clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein) est une protéine ubiquitaire des cellules de mammifères. Son homologue AP180 est quant à lui cerveau-spécifique. La protéine CALM possède un domaine ANTH (AP180 N-terminal homology) structuralement et fonctionnellement similaire au domaine ENTH de l'epsine. À la différence du domaine ENTH, le domaine ANTH n'induit pas de courbure membranaire. Il jouerait plutôt un rôle dans le maintien et la polymérisation du manteau de clathrine, en interagissant directement avec la clathrine mais aussi avec Eps15 (Morgan et al., 2003; Morgan et al., 1999; Zhang et al., 1998). Des travaux très récents ont démontré que la protéine CALM régule la taille des CCVs, grâce à son domaine N-terminal, qui contient une hélice amphipathique interagissant avec les membranes. Ce domaine joue un rôle direct dans la détection de la courbure membranaire ; il a donc une place importante dans la maturation des CCPs (Miller et al., 2015).

L'intersectine : L'intersectine est une protéine multi-domaine qui sert d'échafaudage (deux différentes isoformes, une courte et une longue, peuvent être exprimées) (Figure 10). Elle interagit avec plusieurs protéines impliquées dans l'endocytose comme FCHO ou l'epsine. L'extinction de l'intersectine induit une augmentation du nombre de vésicules de taille aberrante dans la cellule. Elle jouerait alors un rôle organisateur dans la formation des complexes protéiques liés aux CCPs et CCVs en recrutant correctement les partenaires nécessaires à l'appréciation de la courbure des membranes auxquelles elle est associée (Hussain et al., 2001; Okamoto et al.,

1999; Yamabhai et al., 1998). En plus de sa fonction dans le processus de formation de CCPs/CCVs, l'intersectine joue un rôle dans la régulation de plusieurs voies de transduction (O'Bryan, 2010).



Figure 10 : Organisation des domaines des isoformes courte et longue de l'intersectine.

La longue isoforme possède en plus des domaines DH (Dbl homology), PH (Pleckstrin homology) et C2. Le module DH-PH confère une capacité de facteur d'échange de l'intersectine pour la protéine de la famille Rho, Cdc42. Adapté de (O'Bryan, 2010).

vi) La sélection de cargo par le complexe AP-2

En parallèle de la formation du puits de clathrine, le recrutement massif du complexe AP-2 (qui est le complexe le plus abondant des CCPs/CCVs après la clathrine (Blondeau et al., 2004)) va permettre de « piéger » les protéines à internaliser au niveau de l'invagination membranaire. En effet, AP-2 lie directement des motifs reconnus dans la queue cytoplasmique des récepteurs transmembranaires et le PI(4,5)P₂ situé dans la membrane plasmique. Il peut également interagir indirectement avec le cargo via des protéines adaptatrices (Collins et al., 2002; Kelly et al., 2008). Ces protéines adaptatrices, en plus de leur rôle structural et de maturation du CCP, pourraient aussi intervenir dans l'interaction avec les cargos à internaliser.

D'un point de vue global, nous pouvons penser que toutes les protéines adaptatrices sont impliquées dans la courbure et la bonne formation du puits de clathrine, ce qui assure une bonne endocytose de tous les cargos, quelles que soient les protéines adaptatrices qui lui sont associées.

vii) Fission du puits de clathrine et formation d'une vésicule mantelée de clathrine.

La polymérisation de clathrine autour du puits en formation génère une force, toutefois insuffisante pour séparer la vésicule presque formée de la membrane plasmique. Le bourgeonnement de la vésicule recouverte de clathrine est dépendant de l'action d'une enzyme mécano-chimique, la dynamine. Il existe 3 isoformes de la dynamine. La dynamine 1 est exprimée dans les cellules neuronales, la dynamine 3 est fortement exprimée au niveau des testicules, mais aussi des poumons, du cœur et du cerveau. Enfin la dynamine 2 est exprimée dans la quasi-totalité des types cellulaires. Elle est recrutée par des protéines contenant des domaines BAR qui ont une affinité pour les membranes plus fortement courbées que les domaines ENTH/ANTH ; elles vont donc être préférentiellement retrouvées au niveau du cou, où aura lieu la scission entre la membrane et la vésicule. Parmi ces protéines, on retrouve la SNX9 (sorting nexin 9), l'amphiphysine (Lichte et al., 1992) et l'endophiline (Simpson et al., 1999). Elles possèdent toutes des domaines SH3 (Src homology 3) qui interagissent avec le domaine riche en proline de la dynamine (Figure 11) (Lundmark and Carlsson, 2004; Shpetner et al., 1996).

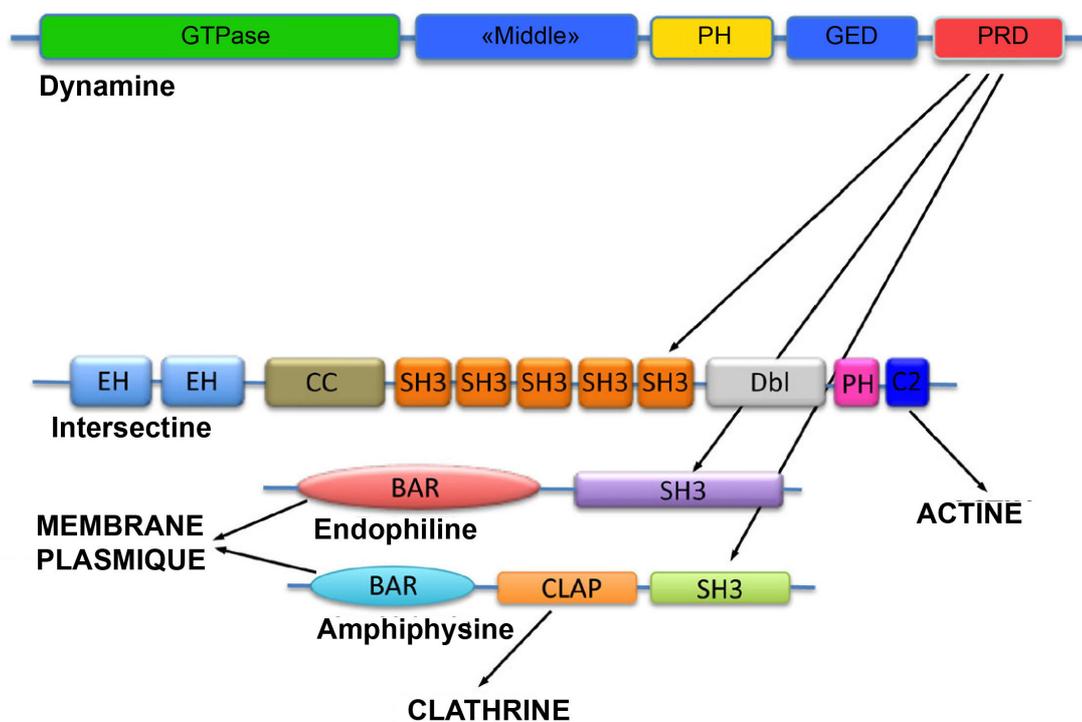


Figure 11 : Organisation schématique de la dynamine et de ses interactions avec les protéines à domaine BAR.

Le domaine riche en prolines de la dynamine (PRD) interagit avec le domaine SH3 de l'intersectine, de l'amphiphysine et de l'endophiline. L'intersectine sert de protéine échafaudage. C'est elle qui recrute la dynamine au niveau du site d'endocytose. L'amphiphysine et l'endophiline contiennent des domaines BAR impliqués dans la constriction du coup de la future vésicule. L'amphiphysine interagit également avec la clathrine, suggérant qu'elle sert d'intermédiaire entre la dynamine et le manteau de clathrine. Adapté de (Sundborger and Hinshaw, 2014).

Ces protéines sont sous forme de dimères, polymérisent et s'associent autour du cou de la vésicule naissante. Il en résulte une accentuation du niveau de courbure qui va faciliter la scission par la dynamine. La dynamine s'associe à la membrane via son domaine PH, se dimérise, puis forme un tétramère. La dimérisation du domaine GTPase est essentielle pour que la dynamine puisse hydrolyser le GTP et être fonctionnelle. De même il a été démontré que la domaine « Middle » est nécessaire pour la tétramérisation de la protéine (Ramachandran et al., 2007). Une fois liée au GTP, la dynamine va exercer une force de constriction qui générera la fission membranaire (Stowell et al., 1999; Sweitzer and Hinshaw, 1998) (Figure 12).

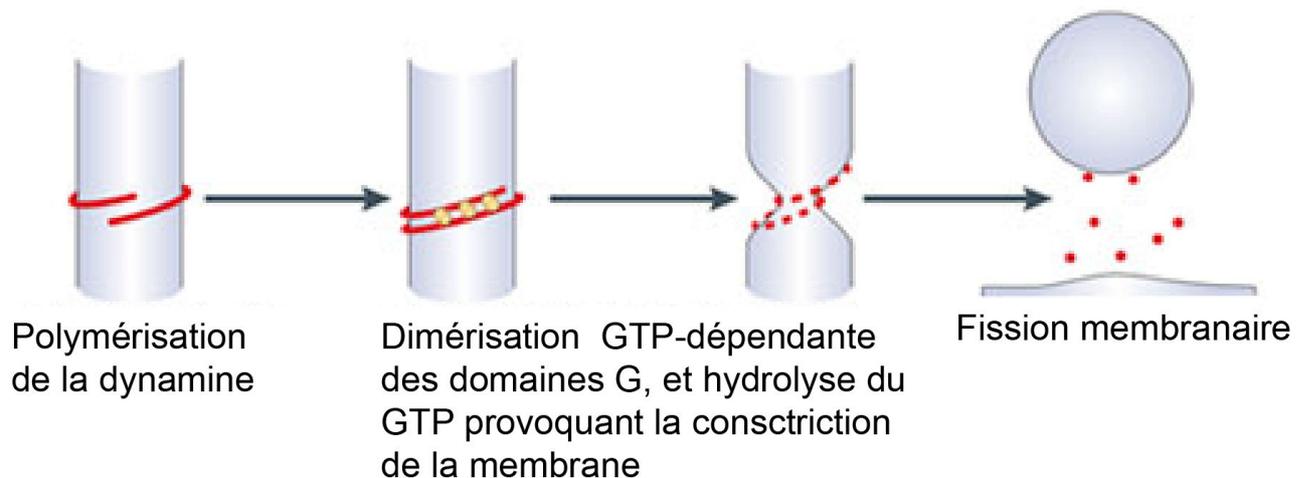


Figure 12 : Schéma d'action de la dynamine.

La polymérisation de la dynamine est le résultat des interactions des monomères puis des dimères de dynamine. La dimérisation GTP-dépendante des domaines G entre les anneaux adjacents de l'hélice de dynamine serait responsable de la stimulation de l'activité GTPase. Ceci a pour conséquence la constriction de la membrane jusqu'à fission membranaire. Adapté de (Ferguson and De Camilli, 2012).

Le mécanisme d'action de la dynamine reste encore à préciser, même si de récentes études de biophysique ont permis d'apporter quelques réponses (Roux, 2014). Dans ces travaux, il a été mis en évidence un dialogue entre la constriction exercée par la dynamine et les courbure et tension membranaires (Roux et al., 2010; Roux et al., 2006).

Pour augmenter la tension membranaire, les protéines à domaine BAR et le PI(4,5)P₂ recrutent également la protéine N-WASP (neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein) qui est un NPF (Nucleation promoting factor). N-WASP est un activateur du complexe Arp2/3 qui va déclencher une polymérisation massive d'actine, mais qui va aussi aider au recrutement de la dynamine. D'autres protéines sont elles aussi recrutées, telle que la cortactine qui va jouer un rôle dans la stabilisation du réseau d'actine formé par Arp2/3.

Ce dialogue complexe entre dynamine, cytosquelette, protéines accessoires et membrane permet une fission efficace du puits recouvert de clathrine, formant ainsi une vésicule, présente à l'intérieur de la cellule (Figure 13).

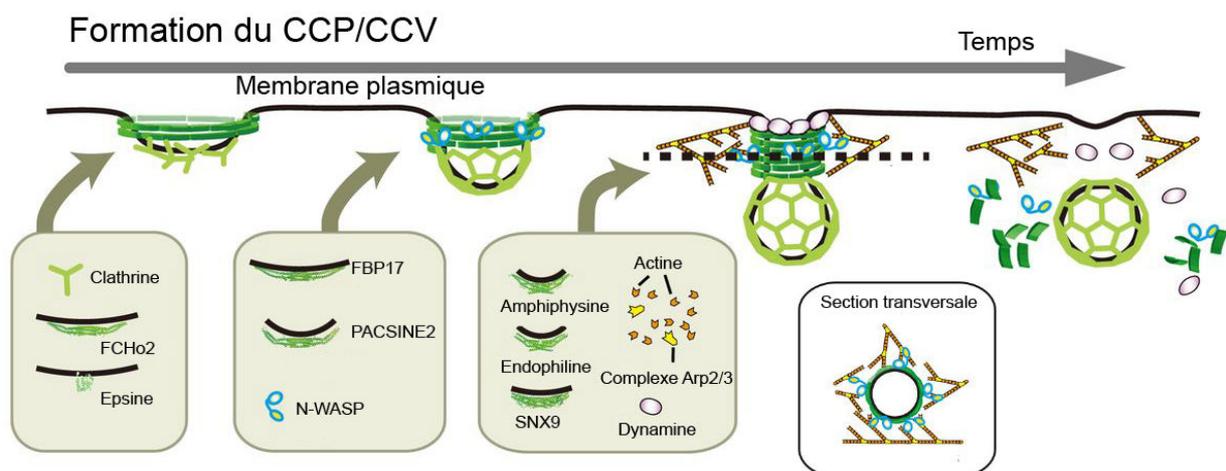


Figure 13 : Séquence de recrutement protéique nécessaire à la formation d'une vésicule recouverte de clathrine.

La formation du puits est initiée par le complexe AP-2 et la protéine à domaine F-BAR FCHo (capable d'induire de faibles courbures membranaires). L'epsine et la clathrine sont concomitamment recrutées. D'autres protéines à domaine F-BAR (FBP17, PACSINE2) sont recrutées, suivies par des protéines à domaine BAR capable d'induire de fortes courbures membranaires (amphiphysine, endophiline ou encore SNX9). Ces protéines à domaine BAR possèdent également des domaines SH3, capable de recruter la dynamine et le facteur N-WASP au niveau du CCP. N-WASP recrute à son tour le complexe Arp2/3 et va permettre une polymérisation d'actine forte et locale pour stabiliser le CCP. Les actions des protéines à domaine BAR, de la polymérisation d'actine et de la dynamine vont ensemble faciliter la fission du CCP en CCV. Adapté de (Suetsugu et al., 2014).

viii) Désassemblage du manteau de clathrine

Une fois la vésicule internalisée, le désassemblage du manteau de clathrine commence progressivement. Une des protéines qui favorise la dissociation du manteau est une phosphatase lipidique, la synaptojanine Elle est recrutée par

l'amphiphysine au niveau des membranes et est capable de déphosphoryler le phosphate en position 5 du PI(4,5)P₂, aboutissant à la formation de PI(4)P (elle peut aussi déphosphoryler le PI(3,4,5)P₃ en PI(3,4)P₂) (de Heuvel et al., 1997; Haffner et al., 2000). Cette déphosphorylation a pour conséquence d'affaiblir les interactions entre la clathrine, les protéines accessoires d'assemblage et les vésicules.

Deux autres protéines jouent un rôle important dans le processus de désassemblage du manteau de clathrine : Hsc70 (heat shock protein cognate 70), une protéine chaperonne, (Schlossman et al., 1984) et l'auxiline (Lemmon, 2001; Ungewickell et al., 1995). L'auxiline, ou GAK (G-associated kinase, dans les tissus non neuronaux), est recrutée juste après le bourgeonnement de la vésicule recouverte de clathrine et s'associe à la clathrine. L'auxiline recrute ensuite Hsc70, laquelle interagit avec des motifs spécifiques situés au niveau du domaine de trimérisation du triskèle et d'où est initiée la réaction de désassemblage. Une molécule d'auxiline est recrutée par triskèle, puis 3 molécules Hsc70 sont séquentiellement recrutées. Une nouvelle molécule Hsc70 n'est recrutée que lorsque la précédente a fini d'agir, ce qui se traduit par une consommation d'ATP (Fotin et al., 2004a; Massol et al., 2006; Rapoport et al., 2008; Rothnie et al., 2011; Xing et al., 2010) (Figure 14).

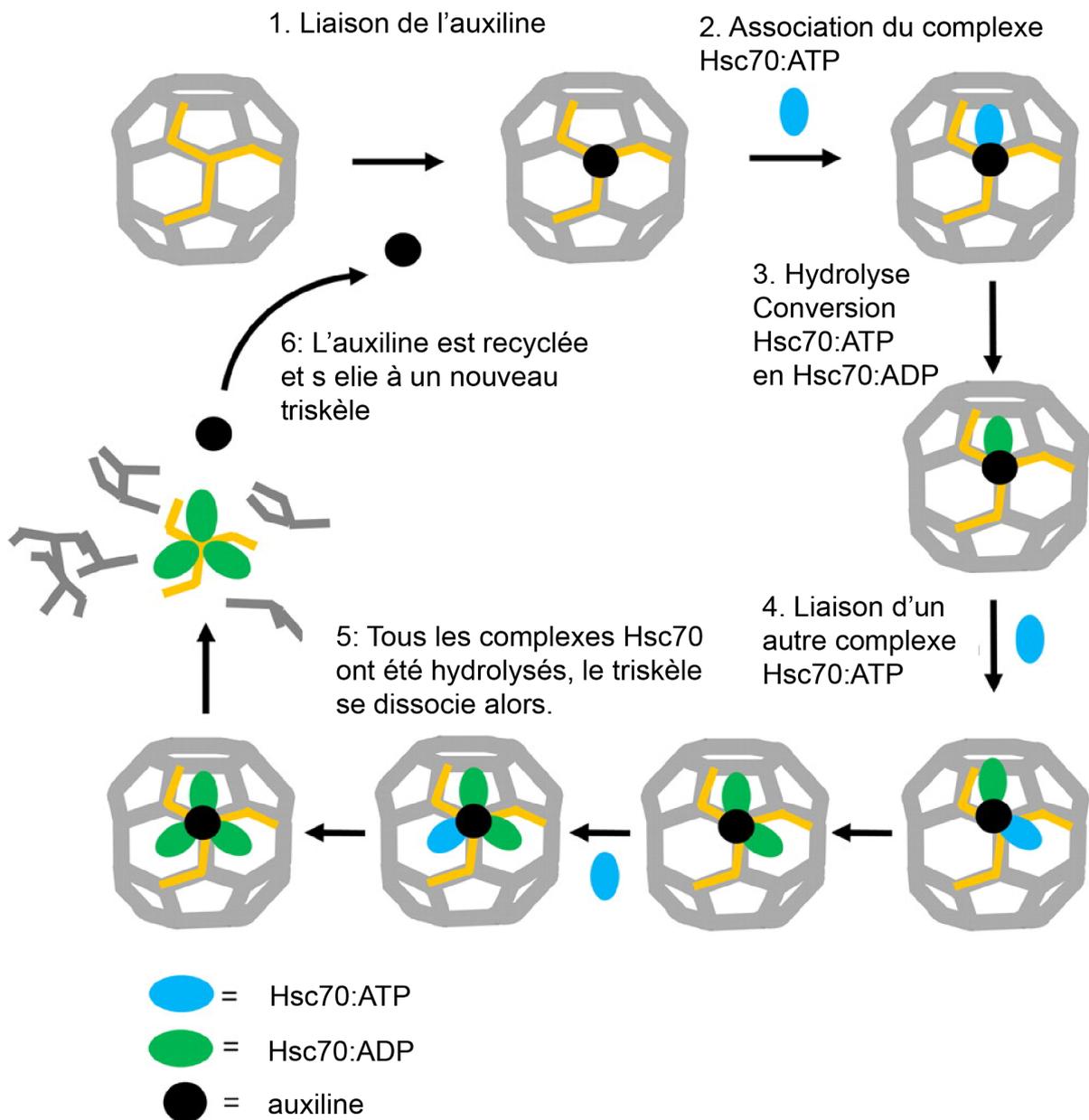


Figure 14 : Exemple de désassemblage d'une cage de clathrine par les protéines auxiline et Hsc70.

Adapté de (Rothnie et al., 2011).

Il est supposé que le désassemblage n'a lieu qu'au moment de la formation de la vésicule car, à ce moment, la cage de clathrine n'est pas complètement fermée, ce qui laisse un libre accès à l'auxiline. Une fois la vésicule dénuée de manteau, toutes les protéines de la machinerie sont libérées dans le cytoplasme et peuvent être recrutées à nouveau pour un autre cycle de formation d'une vésicule recouverte de clathrine.

e) L'endocytose indépendante de la clathrine.

L'endocytose clathrine-dépendante reste la voie la mieux caractérisée de nos jours ; cependant d'autres voies d'endocytose ont été mises en évidence au fil des années. Certaines possèdent d'autres manteaux protéiques, c'est le cas par exemple des cavéoles. Certaines voies indépendantes de la clathrine sont constitutives, d'autres nécessitent un signal spécifique, d'autres, enfin, sont même détournées à leur avantage par des pathogènes. Toutes ces voies possèdent donc des mécanismes, des cinétiques et des machineries moléculaires spécifiques. D'un point de vue global l'endocytose clathrine-indépendante regroupe d'une part des voies d'internalisation de grande capacité (de l'ordre du micron), c'est le cas de la phagocytose et de la macropinocytose, d'autre part des voies d'internalisation de plus petite capacité (inférieure à 200 nanomètres) (Figure 15).

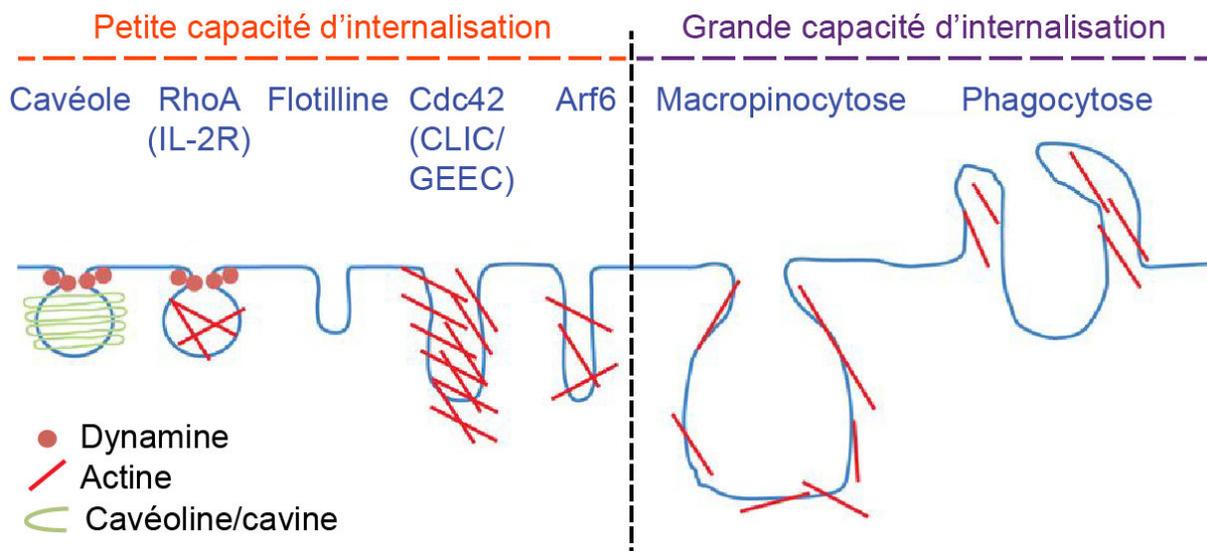


Figure 15 : Diversité des voies d'endocytose indépendantes de la clathrine.

Les voies peuvent être classées selon différents critères : la présence d'un manteau protéique, le recrutement de la dynamine, la polymérisation d'actine, et la structure/taille des invaginations membranaires. Les voies dynamine-dépendantes sont associées avec des vésicules de petite taille comme les cavéoles, tandis que les voies indépendantes de la dynamine présentent des invaginations membranaires plus variées en terme de forme et de taille. Adapté de (Mayor et al., 2014).

i) Les cavéoles

Les cavéoles sont des petites invaginations membranaires de 50-60 nm en forme de bulbes ; elles constituent un composant important de nombreux types cellulaires comme les adipocytes, les cellules endothéliales et musculaires. Si les premières

cavéoles ont été observées dans les années 1950 (Palade, 1953; Yamada, 1955), il faudra toutefois attendre 40 ans pour que soit identifié un de leur composant, la cavéoline-1 (Kurzchalia et al., 1992; Rothberg et al., 1992). Peu après, deux autres homologues furent découverts : la cavéoline-2 et la cavéoline-3. Cette dernière est spécifiquement exprimée au niveau des tissus musculaires (Scherer et al., 1996; Way and Parton, 1996). Les cavéoles possèdent un manteau protéique dont la forme en spirale est très caractéristique (Figure 16).

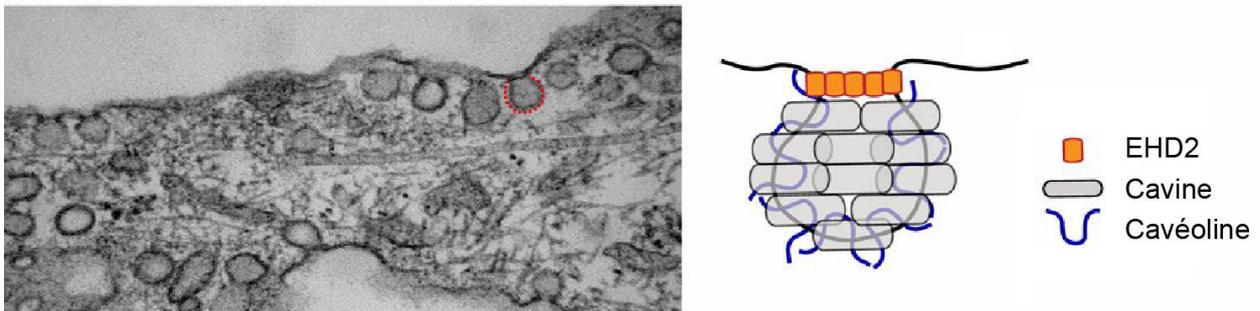


Figure 16 : Assemblage des cavéoles.

Sur le panneau de gauche, une image de microscopie électronique sur laquelle figure des bulbes cavéolaires (ligne rouge en pointillé) à la surface d'un fibroblaste. Sur la droite figure un modèle simplifié du manteau des cavéoles. Les cavines sont les protéines membranaires périphériques qui recouvrent le bulbe avec les cavéolines. Ces dernières sont ancrées dans la couche interne de la membrane. EHD2 est associé avec le cou de la structure et peut moduler la dynamique des cavéoles. Adapté de (Kovtun et al., 2015)

On a longtemps pensé que ce manteau correspondait à la cavéoline, mais une seconde famille de protéines abondantes dans les cavéoles fut mise en évidence : les cavines (Hill et al., 2008; Vinten et al., 2005). On dénombre 4 cavines chez les mammifères : la cavine1 (ou PTRF) (Jansa et al., 1998) qui est essentielle pour la formation des cavéoles et dont le profil d'expression est très large, la cavine2 (ou SDPR) (Burgener et al., 1990), la cavine3 (ou PRKCDBP) (Izumi et al., 1997) et la cavine4 (ou MURC) qui est une isoforme spécifique des cellules musculaires (Ogata et al., 2008). Des études récentes de microscopie électronique et de cristallographie ont permis d'observer que le manteau protéique associé aux cavéoles ne serait en réalité qu'une polymérisation de cavines (Gambin et al., 2014; Kovtun et al., 2014; Ludwig et al., 2013). Il est établi que d'autres protéines s'associent aux cavéoles, comme les protéines EHD2 et PACSINE2 (aussi connue sous le nom de syndapine2). La composition de la membrane lipidique est importante pour le bon recrutement des cavines, notamment le cholestérol, la phosphatidylsérine (PS) et le

PI(4,5)P₂. La polymérisation d'actine intervient également dans le processus d'internalisation de ces vésicules.

Concernant leur potentiel d'endocytose, les cavéoles peuvent se détacher de la membrane plasmique pour former une vésicule d'endocytose. On retrouve principalement deux fractions de cavéoles, l'une immobile, présente en permanence à la membrane plasmique, l'autre mobile, soumise à un cycle continu d'évènements de fusion et fission rapides, appelé « kiss and run » (Pelkmans and Zerial, 2005). Cette étude a été menée en suivant la cavine-1 étiquetée avec la GFP (Green fluorescent protein) par TIRFM (Total internal reflection fluorescence microscopy). Une autre étude plus récente, utilisant la même approche mais avec une lignée cellulaire exprimant de façon stable la cavine-1-GFP (avec un niveau d'expression plus faible comparé à l'expression transitoire), a permis de démontrer que lors de leur entrée en interphase, les cellules internalisent 85% de leurs cavéoles (Boucrot et al., 2011). Cette étude a été complétée par une approche de microscopie électronique, apportant des éléments de précision sur le bourgeonnement des vésicules issues de cavéoles cavine-1-GFP positives. Une fois internalisée, une partie des vésicules refusionne avec la membrane plasmique. Ce phénomène « abortif » n'a pour le moment pas été mieux décrit et compris au niveau fonctionnel. En revanche, l'autre partie des vésicules internalisées fusionne avec les endosomes précoces ; les protéines composant les vésicules sont recyclées à la membrane plasmique pour reformer une cavéole.

Les cavéoles sont donc des structures dynamiques qui peuvent être régulées par d'autres facteurs protéiques. Peu d'éléments sont, à l'heure actuelle, connus à ce sujet. On sait que la dynamine est très certainement impliquée dans le phénomène de scission des vésicules internalisées. *A contrario*, les protéines EHD2 et PACSINE2 ont un effet négatif sur l'endocytose et le bourgeonnement des vésicules issues de cavéoles (Figure 17). En effet, l'extinction de la protéine EHD2 augmente le nombre de ces évènements (Moren et al., 2012; Stoeber et al., 2012), suggérant fortement son implication dans la stabilité des structures cavéolaires.

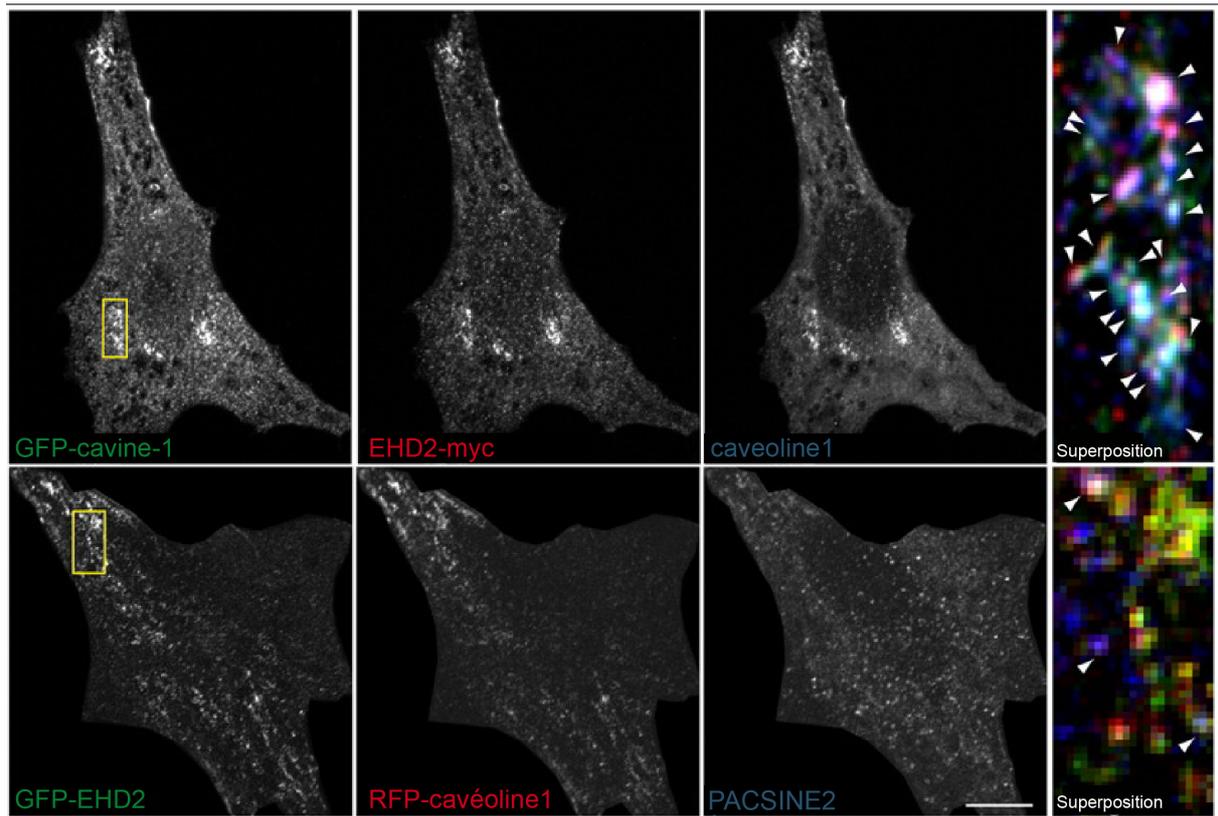


Figure 17 : EHD2 et PACSINE2 sont associées aux cavéoles.

Image de microscopie à fluorescence de cellules 3T3-L1 coexprimant myc-EHD2 et GFP-cavine-1 avec immunomarquage de la cavéoline1 endogène (panneau haut) ou GFP-EHD2 et RFP-cavéoline1 avec immunomarquage de la PACSINE2 endogène (panneau bas). Les sélections (rectangles jaunes) montrent une superposition des images. Les flèches blanches indiquent les structures positives pour les 3 protéines. Barre d'échelle 10 µm. Adapté de (Moren et al., 2012).

Même si elles furent décrites initialement comme des structures d'endocytose, la bonne connaissance de l'assemblage et de la dynamique des cavéoles permet aujourd'hui de supposer, qu'elles sont également impliquées dans d'autres processus biologiques. En effet, les cavéoles ne sont présentes que dans certains types cellulaires, à une densité variable. De plus, elles ne servent pas à internaliser des ligands spécifiques et sont plutôt détournées par des pathogènes pour faciliter leur entrée dans la cellule (virus SV40, toxine cholérique).

Il a été démontré que l'utilisation de glycosphingolipides stimule l'endocytose des cavéoles, qui est souvent associée à une internalisation massive de la β 1-intégrine. Un lien pourrait donc exister entre l'endocytose cavéole-dépendante et l'adhérence cellulaire (Pelkmans et al., 2005; Sharma et al., 2005; Sottile and Chandler, 2005). Ces données font des cavéoles des structures d'endocytose à manteau protéique moins importantes que celles de clathrine. C'est pourquoi, depuis plusieurs années,

les cavéoles sont associées à d'autres mécanismes, notamment dans la réponse au stress mécanique, le métabolisme lipidique et la signalisation dans certains carcinomes (Martinez-Outschoorn et al., 2015; Nassoy and Lamaze, 2012; Parton and del Pozo, 2013).

ii) La voie de la flotilline

Chez l'Homme on dénombre deux gènes codant pour les flotillines 1 et 2 (les gènes flotilline 1 et 2, également connus respectivement sous le nom de Reggie 2 et 1) (Babuke and Tikkanen, 2007). Les flotillines présentent une forte homologie de séquence avec la cavéoline1, ce qui laisse supposer qu'elles pourraient jouer des rôles similaires. Les flotillines sont trouvées sous forme d'oligomères dans des microdomaines membranaires, dont sont exclues les cavéoles ; elles sont impliquées dans l'endocytose de la protéine à ancre GPI CD59 et de la toxine cholérique (Figure 18) (Frick et al., 2007; Glebov et al., 2006).

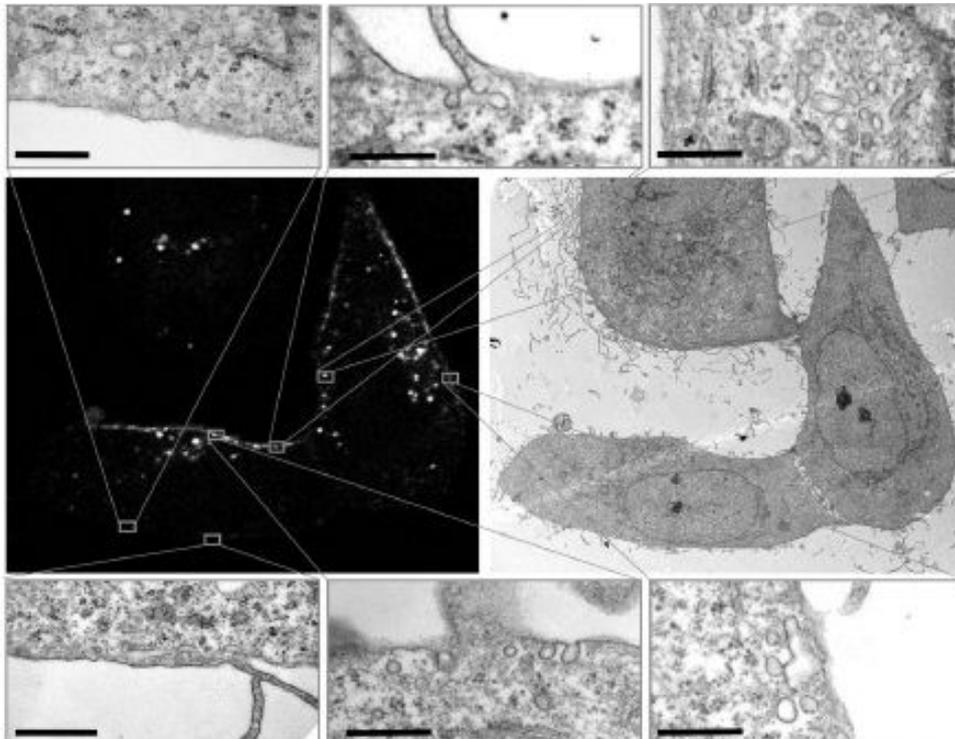


Figure 18 : Ultrastructure des invaginations membranaires induites par la flotilline.

Corrélation d'images de microscopie à fluorescence et électronique provenant de cellules surexprimant les flotillines 1 et 2 fusionnées à la GFP. Les régions contenant les flotillines-GFP présentent de nombreuses invaginations membranaires et vésicules sans manteau. À l'inverse, les régions dénuées de fluorescence ne présentent pas de telles structures ou en nombre très réduit. Barres d'échelle 200 nm. Adapté de (Frick et al., 2007).

Au niveau fonctionnel, aucune machinerie moléculaire n'a pour le moment été identifiée. Il est donc difficile de définir clairement la fonction des flotillines endogènes dans l'endocytose, ainsi que le mécanisme qui donne naissance aux vésicules.

iii) La voie d'endocytose du récepteur à l'interleukine 2 (IL-2R)

Comme les cavéoles, cette voie est indépendante de la clathrine, dépendante de la dynamine, mais ne présente pas de manteau protéique. L'IL-2R est retrouvé concentré dans des invaginations membranaires dépourvues de manteau. Il peut être internalisé sans avoir lié son ligand dans des vésicules d'environ 50 à 100 nm. Le cholestérol est également important pour cette voie car les chaînes composant l'IL-2R, et notamment la chaîne β , est retrouvée dans des microdomaines membranaires (Lamaze et al., 2001). Dans ces microdomaines, une machinerie actine-dépendante est mise en place, impliquant la cortactine et N-WASP. L'IL-2R va activer, lors de son internalisation, la cascade de signalisation de la PI3K, ce qui va faciliter le recrutement et l'activation de RhoA et Rac1. Rac1 recrute ensuite PAK (p-21 activated kinase) qui phosphorylera elle-même la cortactine, laquelle pourra alors recruter N-WASP. N-WASP activera ensuite le complexe Arp2/3 ; une forte polymérisation d'actine sera alors induite, facilitant l'internalisation du récepteur (Figure 19) (Basquin et al., 2013; Gesbert et al., 2004; Grassart et al., 2008).

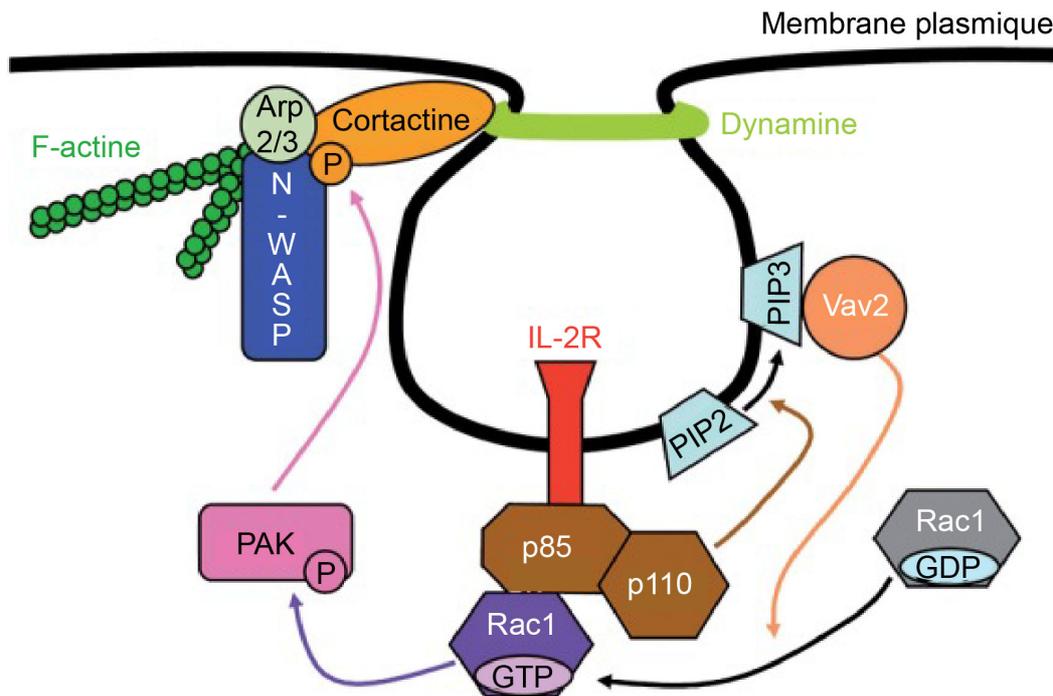


Figure 19 : Acteurs de la voie d'endocytose de l'IL-2R β .

L'IL-2R β , en association avec p85, activerait la PI3K, menant à l'induction de Vav2 et à l'activation de Rac1. Rac1 pourrait ensuite être recrutée au niveau du récepteur, grâce à son association avec p85. Ceci activerait alors la cascade Rac1/PAK1/N-WASP et la polymérisation d'actine durant l'endocytose. Adapté de (Basquin et al., 2013).

Cette voie d'endocytose est donc très bien caractérisée dans le cas de la chaîne β de l'IL-2R. Cette chaîne est également commune à l'IL-15R. Il a été démontré également que la chaîne γ de l'IL-2R est internalisée via le même mécanisme. Cette dernière est en revanche partagée par un plus grand nombre de récepteurs aux interleukines (IL-2R, IL-4R, IL-9R, IL-15R et IL-21) (Gesbert et al., 2004; Sauvonnnet et al., 2005). D'un point de vue physiologique, il est important de connaître le comportement de cette chaîne, car de nombreuses mutations sont responsables de graves syndromes (immunodéficience sévère, schizophrénie). Enfin, une seule étude a mis en évidence que la protéine APP (amyloid precursor protein), fortement impliquée dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, suivrait la même voie d'endocytose (Saavedra et al., 2007).

iv) La voie CLIC/GEEC

Elle correspond à la voie d'endocytose des protéines à ancre GPI. L'internalisation se fait via des structures tubulaires insensibles à l'inhibition de la clathrine et de la

dynamine, mais sensibles à l'inhibition de Cdc42, une petite GTPase de la famille Rho (Kirkham et al., 2005; Sabharanjak et al., 2002). Les molécules internalisées via cette voie sont retrouvées dans des GEECs (GPI-anchored protein-enriched early endosomal compartments) ; ces GEECs sont le résultat de la fusion des structures tubulaires sans manteau, les CLICs (clathrin-independent carriers). Le mécanisme qui permet l'enrichissement en protéines à ancre GPI, au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, n'est pas connu. Il semblerait que le processus soit initié par le recrutement du facteur d'échange d'Arf1, GBF1. Par la suite, Arf1, la protéine à domaine BAR GRAF1 (GTPase regulator associated with focal adhesion kinase 1), Cdc42, cholestérol et actine ont été identifiés comme facteurs intervenant de ce processus d'endocytose. Le maintien du cycle de Cdc42 entre ses formes active et inactive permet le recrutement dynamique de la machinerie de polymérisation d'actine, nécessaire pour une endocytose efficace (Chadda et al., 2007; Gupta et al., 2009; Kumari and Mayor, 2008; Lundmark et al., 2008).

Outre l'endocytose des protéines à ancre GPI, la voie CLIC/GEEC permet l'endocytose de la glycoprotéine de surface CD44 et de la dysférine ; elle serait responsable du recyclage/renouvellement de la membrane plasmique (en moins de 15 minutes dans des fibroblastes embryonnaires de souris) (Howes et al., 2010).

v) La voie Arf6-dépendante

Cette voie, également clathrine et dynamine-indépendante, fut identifiée il y a plusieurs années par son association avec Arf6 (Radhakrishna and Donaldson, 1997). Elle dépend en revanche du cholestérol et du cytosquelette d'actine. Comme Cdc42 dans le cas de l'endocytose CLIC/GEEC, le maintien du cycle d'activation/inactivation d'Arf6 à la membrane plasmique est essentiel, non pour l'internalisation (dans la plupart des cas), mais pour le devenir intracellulaire des vésicules via l'activation de la phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (Naslavsky et al., 2003). En activant cette kinase, Arf6 augmente la quantité de PI(4,5)P₂ à la membrane plasmique et facilite donc aussi l'endocytose clathrine-dépendante.

Les protéines internalisées via cette voie sont impliquées dans le transport de nutriments (Glut1, CD98, Lat1), les fonctions immunitaires (CMH-I, CD1a) et des protéines à ancre GPI (CD55 et CD59) (Eyster et al., 2009; Maldonado-Baez et al., 2013).

Cette voie Arf6 présente des similitudes avec la voie CLIC/GEEC ; cependant, ces deux voies sont toujours considérées de façon indépendante. La principale distinction réside dans les mécanismes d'internalisation. Une étude en faveur de cette hypothèse a démontré que dans des cellules où la voie CLIC/GEEC est fonctionnelle, la voie Arf6 joue peu ou pas de rôle dans l'internalisation des cargos CLIC/GEEC-spécifiques (Kumari and Mayor, 2008).

vi) La voie FEME

Cette voie fut décrite ces derniers mois dans une étude d'Emmanuel Boucrot (Boucrot et al., 2015). La voie FEME, pour Fast endophilin mediated endocytosis, met en évidence le rôle de l'endophiline A (surtout décrite dans l'endocytose clathrine-dépendante) dans un processus d'internalisation tubulaire rapide, indépendant de la clathrine au niveau des fronts de migration cellulaires. Ce mécanisme d'internalisation est également distinct d'autres marqueurs d'endocytose, tels que la cévéloline-1, les flotillines 1 et 2 ou GRAF1. Plusieurs facteurs semblent être impliqués dans le processus d'internalisation : la dynamine, le cholestérol, l'actine, Rac, Rho, la PI3K et PAK1. De plus, le recrutement de l'endophiline A à la membrane plasmique semblerait s'effectuer via la lamellipodine, laquelle interagit avec le PI(3,4)P₂ retrouvé au niveau du front de migration.

La voie FEME intervient dans l'internalisation de différents récepteurs, uniquement après leur activation par leurs ligands respectifs. Parmi eux, on retrouve des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) comme le récepteur β1-adrenergique (mais pas le β2), des récepteurs aux facteurs de croissance (EGF, HGF, FGF, VEGF, PDGF, NGF et IGF-1 mais pas TGF-β ni BMP2) ou encore le récepteur à l'interleukine 2. Tous ces récepteurs sont retrouvés dans des structures contenant l'endophiline A après stimulation au niveau du front de migration de la cellule. Il est connu que l'endophiline A interagit directement avec le récepteur β1-adrenergique et avec l'EGFR et l'HGFR via CIN85 et Cbl. En revanche, cette voie n'affecte pas l'internalisation des protéines à ancre GPI.

La toute nouvelle voie FEME semble être impliquée dans l'endocytose de nombreux cargos et dans plusieurs processus cellulaires. Il faut maintenant attendre l'arrivée d'études complémentaires pour mieux en comprendre les implications dans la cellule.

vii) Phagocytose et macropinocytose

Ces deux mécanismes indépendants de la clathrine se distinguent de tous les autres par leur plus grande capacité d'internalisation, formant des vésicules pouvant atteindre jusqu'à 5 microns (appelées phagosome et macropinosome). Ils sont préférentiellement retrouvés dans les cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles) et interviennent dans la surveillance immunitaire et l'élimination de pathogènes. Ces deux voies peuvent également être détournées par des virus, afin d'entrer dans la cellule (*Salmonella*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Vaccinia virus*...) (Mercer and Helenius, 2009; Sarantis and Grinstein, 2012).

La phagocytose est un mécanisme complexe de défense de l'immunité innée contre l'agression de pathogènes. Elle fait intervenir des récepteurs spécifiques, tels que les récepteurs aux fragments cristallisables des immunoglobulines (RFc) ou le récepteur du complément CR3. Les cellules phagocytaires reconnaissent donc des particules opsonisées par le complément ou des immunoglobulines. La phagocytose dépend donc d'un groupe de récepteurs appelés récepteurs phagocytaires, d'une très forte polymérisation d'actine mais aussi d'apport de membrane intracellulaire au niveau du site de phagocytose permettant une extension membranaire efficace (Botelho and Grinstein, 2011; Flannagan et al., 2012). Les cellules phagocytaires, en particulier les macrophages, jouent aussi un rôle très important d'une part dans l'élimination de cellules apoptotiques et de débris cellulaires, d'autre part dans l'homéostasie tissulaire, enfin dans le processus de cicatrisation.

La macropinocytose est décrite comme la formation de grandes protrusions de la membrane plasmique, qui vont ensuite se replier sur elles-mêmes et fusionner. C'est une méthode de capture en phase fluide à la périphérie cellulaire d'une grande quantité du milieu extracellulaire. Elle permet aux cellules d'échantillonner leur environnement. C'est, par exemple, le cas des cellules dendritiques immatures qui patrouillent dans notre organisme, à la recherche d'agents pathogènes via ce mécanisme. Plusieurs éléments de la machinerie impliquée dans ce phénomène ont pu être décrits. Les composants impliqués sont, le cholestérol, dont les microdomaines permettent le recrutement de Rac1 qui interagit avec PAK1, mais aussi plusieurs kinases activées via d'autres voies d'endocytose (PI3K, Src, Ras) (Kerr and Teasdale, 2009; Swanson and Watts, 1995) (Figure 20).

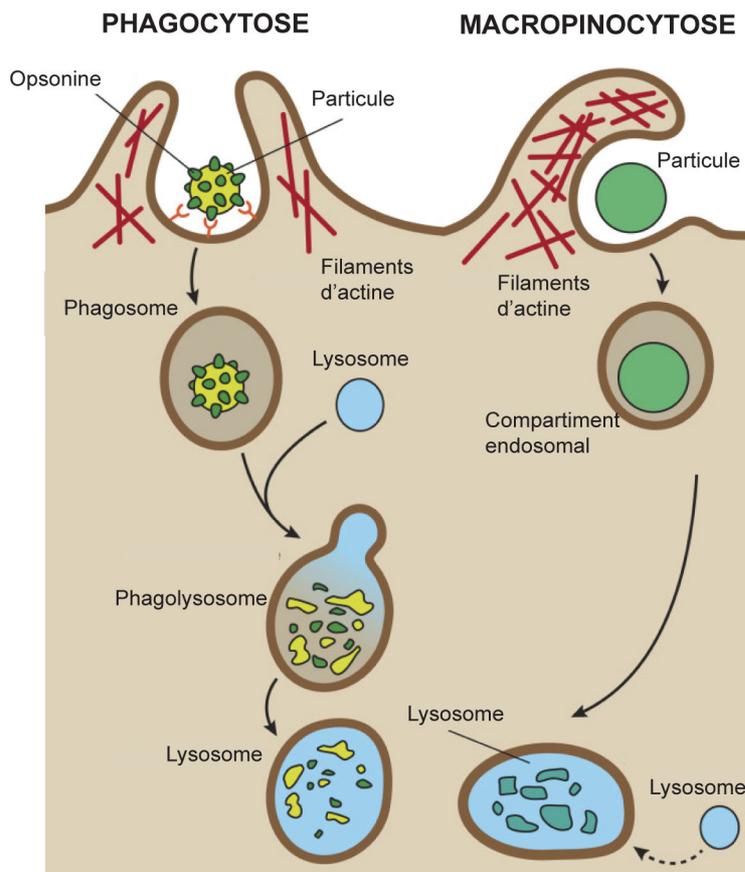


Figure 20 : Vue d'ensemble des voies de phagocytose et de macropinocytose.

La phagocytose a principalement lieu dans les macrophages grâce à un mécanisme actine-dépendant impliquant de nombreux récepteurs membranaires spécialisés (mannose, immunoglobuline, complément). La particule souvent opsonisée est reconnue par ces récepteurs et est internalisée dans une vésicule appelée phagosome. La fusion du phagosome avec les compartiments lysosomiaux de la voie d'endocytose aboutit à la formation d'un phagolysosome où les particules internalisées sont dégradées par digestion enzymatique. La macropinocytose induit la formation de larges vésicules appelées macropinosomes qui sont le résultat de protrusions membranaires rabattues sur la membrane plasmique. Le contenu des macropinosomes est dégradé suite à la fusion avec les lysosomes. Adapté de (Stern et al., 2012)

Enfin un dernier phénomène d'internalisation de grande capacité a été décrit : les vagues dorsales circulaires (Figure 21). Ce phénomène a été observé en présence de forte concentration de facteur de croissance (EGF, HGF) et correspond à la formation de vagues membranaires sur la face dorsale de la cellule ; il est associé avec la formation de structures tubulaires d'endocytose. Le rôle de ces structures reste peu compris. Certaines études mettent en évidence des similitudes avec les invadopodes et les podosomes qui, eux, sont trouvés sur la face ventrale des cellules (Buccione et al., 2004).

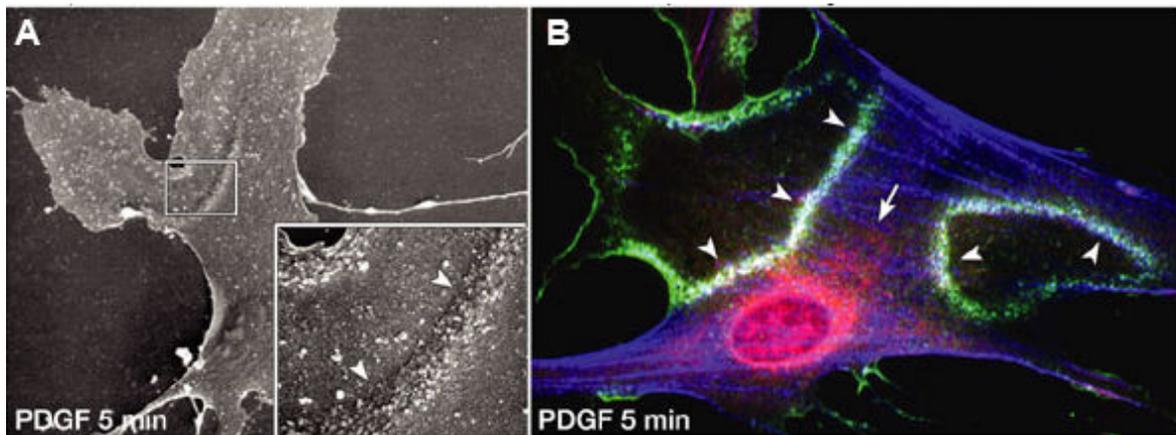


Figure 21 : Structure d'une onde dorsale circulaire.

(A) Image de microscopie électronique à balayage de fibroblaste de prépuce humain stimulé avec du PDGF (patelet-derived growth factor) pendant 5 min. Une crête en forme d'arc qui déforme la membrane plasmique dorsale est observée (grossissement inférieur droit). L'onde dorsale circulaire semble composée de nombreuses petites bosses uniformes qui émanent de la membrane dorsale (têtes de flèches) et balayent toute la cellule en forme d'arc. (B) Cellule fibroblastique NIH 3T3 fixée après stimulation au PDGF pendant 5 min et immunomarquées avec un anti-cortactine (vert), anti-dynamine (rouge) et l'actine filamenteuse (bleu). Une colocalisation importante des trois protéines (blanc) a lieu au niveau antérieur et postérieur des ondes (têtes de flèches). Il est à noter que les fibres de stress (bleu) sont présentes dans toute la cellule mais sont majoritairement absentes au niveau des régions où ont lieu les ondes dorsales. Adapté de (Buccione et al., 2004).

f) Endocytose : Que reste-t-il à découvrir ?

Comme nous venons juste de le voir, l'endocytose dépendante de la clathrine est un processus complexe et finement régulé. Cependant, depuis plusieurs années, d'autres voies indépendantes de la clathrine ont été décrites. Ces voies ne nécessitent pas systématiquement de signal d'internalisation ou de manteau protéique. D'un point de vue global, on remarque souvent que les lipides, surtout le cholestérol (et les microdomaines qu'il forme), ainsi que les machineries de polymérisation d'actine (et les facteurs la régulant) sont très importants dans ces phénomènes, tout comme le PI(4,5)P₂ est essentiel dans l'endocytose dépendante de la clathrine (Figure 22).

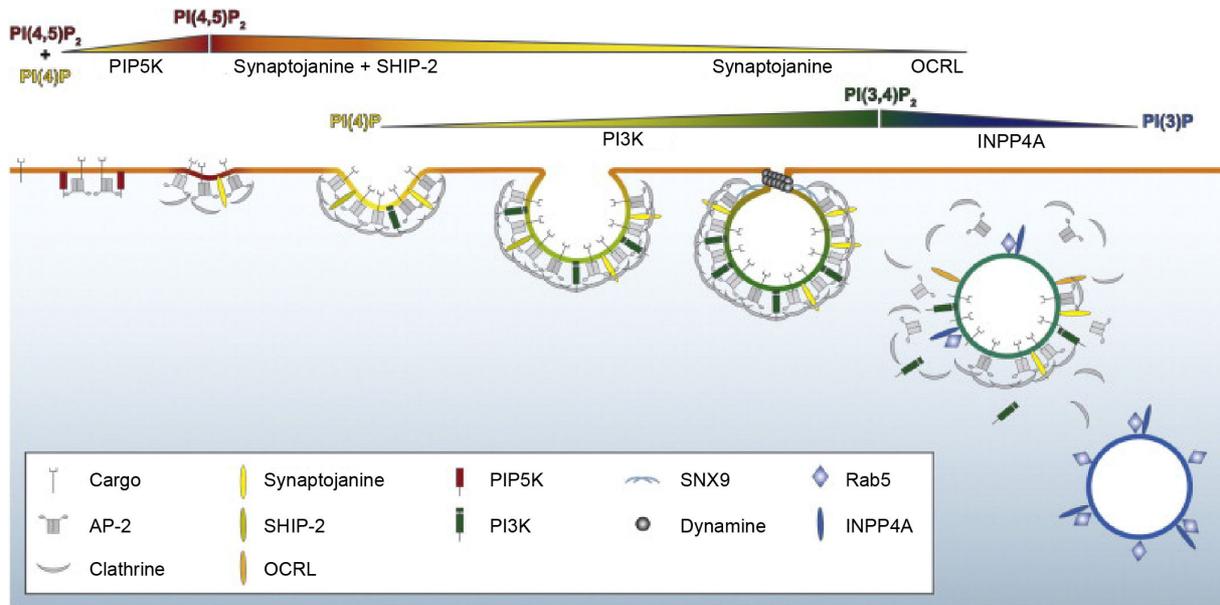


Figure 22 : Cinétique d'interaction entre le PI(4,5)P₂ et les protéines accessoires impliquées dans l'endocytose dépendant de la clathrine.

La nucléation est le résultat de l'action de protéines précoces (FCHo, AP-2) avec la clathrine au niveau de sites de la membrane plasmique riches en PI(4,5)P₂ (rouge) qui sont générés par la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase de type I (PIP5K). La maturation du CCP est partiellement induite par la conversion du PI(4,5)P₂ en PI(3,4)P₂ (vert). Le PI(3,4)P₂ est issu de la catalyse du PI(4)P (jaune) par la PI3K et facilite le recrutement de la SNX9. La synthèse du PI(3,4)P₂ peut être accompagnée par la déphosphorylation du PI(4,5)P₂ en PI(4)P par la synaptojanine ou par SHIP-2. Dans les neurones et possiblement dans d'autres types cellulaires, la dissociation du manteau de clathrine requiert l'activité d'une isoforme courte de la synaptojanine pour enlever le PI(4,5)P₂. Finalement, le PI(3,4)P₂ est converti en PI(3)P (bleu) par la phosphatase INPP4A/B (effecteur de Rab5) lorsque la vésicule est dirigée vers les endosomes précoces. Adapté de (Posor et al., 2015).

Ces informations mettent en évidence le besoin d'études biochimiques et biophysiques, concernant les lipides et les membranes cellulaires. Le débat concernant la possibilité d'échafauder des puits d'endocytose sans clathrine et sans cavéoline reste donc ouvert et les années à venir nous apporteront certainement de nouvelles informations sur la mécanistique de ces processus (Posor et al., 2015) (Johannes et al., 2015).

2) Trafic vésiculaire et adressage

Une fois formées, les vésicules d'endocytose vont suivre un parcours bien précis, qui est régi par de nombreuses familles de protéines régulant le trafic intracellulaire. Nous allons dans un premier temps explorer les principaux acteurs de cette

machinerie complexe, avant de détailler les différentes voies vers lesquelles peuvent être adressés les cargos internalisés.

a) Petites GTPases, la superfamille Ras

i) Vue d'ensemble

La superfamille Ras est une superfamille composée de 5 branches principales : Ras, Ran, Rab, Rho et Arf (Figure 23). Ces 5 familles de protéines sont impliquées dans la quasi-totalité des processus du trafic intracellulaire. Ce sont toutes des petites GTPases (Le qualificatif de « petite » provient de la comparaison avec les protéines G trimériques qui sont de plus gros complexes, et de leur petit poids moléculaire compris entre 20 et 25 kDa). Comme toutes les GTPases, elles existent sous une forme active et sous une forme inactive. Toutes ces protéines possèdent la même organisation générale de leurs domaines (Figure 24).

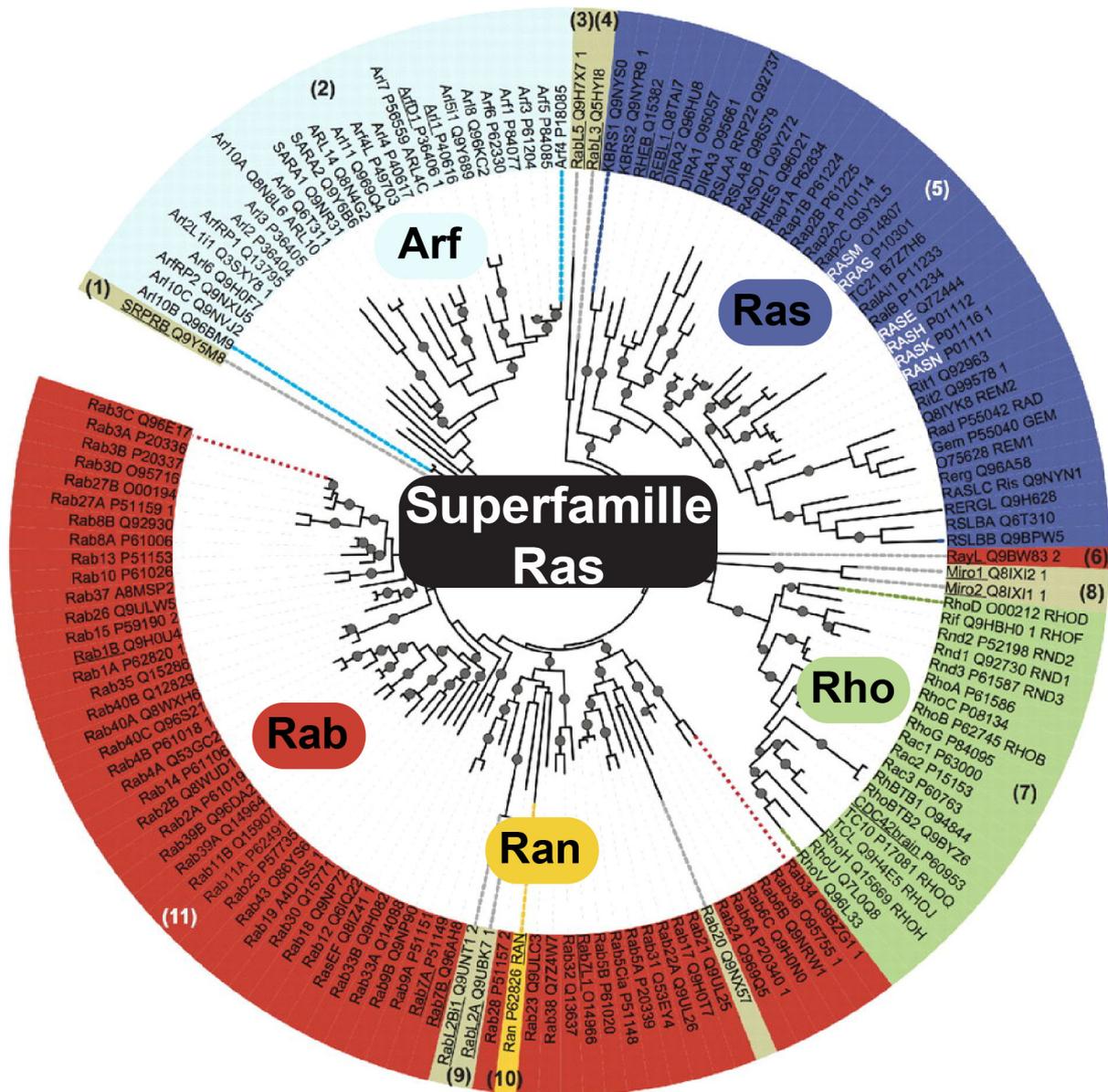


Figure 23 : Arbre phylogénétique de la superfamille Ras.

Adapté de (Rojas et al., 2012)

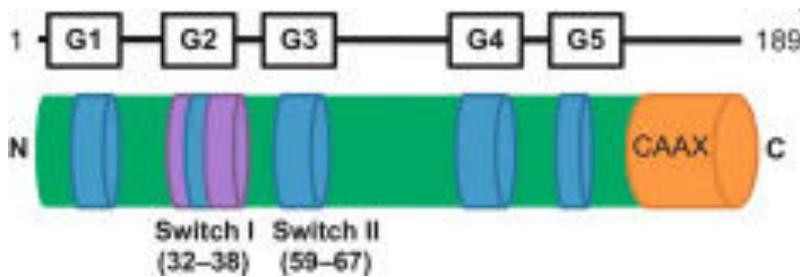


Figure 24 : Domaines conservés chez les protéines de la superfamille Ras. (modèle de présentation : Ras).

Les motifs G (G1 à G5) (bleu) sont 5 courtes portions de séquence conservées. Les motifs G1 et G3 contiennent des résidus essentiels dans la liaison et l'hydrolyse des nucléotides. Le motif G2 comprend des résidus qui définissent le domaine effecteur (violet), site où ont lieu les interactions avec les effecteurs des la GTPase. Le domaine G5 contient des résidus qui interagissent indirectement avec les nucléotides. En C-terminal est située une séquence d'adressage membranaire (orange). Dans le cas des protéines des familles Ras et Rho, ce domaine est appelé CAAX (C pour cystéine, A pour acide aminé aliphatique et X pour le résidu C-terminal). Les protéines Rabs se terminent avec un motif CAAX, CC, ou CXC. Ces motifs sont reconnus par des prényltransférases qui initient une série de modifications critiques pour l'association des petites GTPases avec les membranes. Par exemple, les 2 cystéines des Rabs sont modifiées par l'addition d'un groupement géranylgeranyl. Cette réaction est catalysée par une RabGGtase (Rab géranylgeranyltransférase). Adapté de (Tetlow and Tamanoi, 2013).

ii) Cycle d'activation des petites GTPases

Les petites GTPases alternent entre deux formes, l'une liée au GDP, l'autre liée au GTP. Celle liée au GDP est dite inactive, celle liée au GTP est dite active car capable de recruter des effecteurs. La liaison au GDP étant en général très forte, et l'activité GTPase intrinsèque très faible, deux familles de facteurs interviennent dans le changement d'état des petites GTPases. La première famille est celle des facteurs d'échange (Kolonko et al.) qui facilitent la dissociation du GDP. Une fois fixé sur les GTPases, le GEF va faire diminuer l'affinité du nucléotide pour la protéine, en déformant le site de fixation du phosphate. Ensuite, un nouveau nucléotide va à son tour entrer en compétition avec le GEF et faire diminuer l'affinité du GEF pour la protéine (Figure 25).

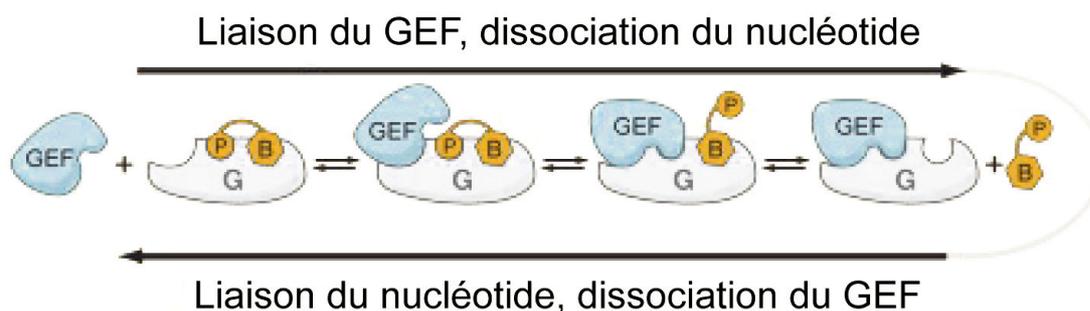


Figure 25 : Mécanisme d'échange de nucléotide induit par un GEF.

La réaction d'échange se produit au cours d'étapes successives et réversibles. Le nucléotide (orange) interagit avec la protéine G (gris) grâce à sa base (B) et ses phosphates (P). Le GEF (bleu) entre en compétition avec le nucléotide pour se lier avec la protéine G et stimule l'échange nucléotidique. La compétition fait intervenir des interactions entre le GEF et le nucléotide. Adapté de (Bos et al., 2007)

Les petites G ont approximativement la même affinité pour le GDP que pour le GTP. Dans la cellule, en revanche, la concentration de GTP est environ 10 fois supérieure à la concentration de GDP. Ceci explique pourquoi lorsqu'un GEF agit, le GDP dissocié va être remplacé par un GTP dans la quasi-totalité des cas. Les GEFs favorisent donc l'activation des GTPases.

A l'inverse, les GAPs (GTPase-activating proteins) sont des protéines qui stimulent l'activité GTPases des petites G. En stimulant l'hydrolyse du GTP en GDP, ces facteurs inactivent donc leur protéine cible.

GEFs et GAPs sont eux-mêmes régulés via différents mécanismes qui régissent l'état d'activation des petites GTPases et tous leurs effecteurs. De plus, certaines petites GTPases possèdent un groupement farnésyl ou géranylgeranyl dans leur partie C-terminale, leur donnant la propriété de s'associer à des membranes. Leur cycle GDP/GTP est alors respectivement associé à une localisation cytosolique/membranaire. Cette association/dissociation des membranes est modulée par un autre groupe de facteurs appelés GDIs (guanine dissociation inhibitors) qui forment des complexes solubles avec les petites GTPases, en isolant leur groupement lipidique (Figure 26). La dissociation des Rabs et des GDIs se fait grâce à un facteur GDF (GDI displacement factor) (Dirac-Svejstrup et al., 1997).

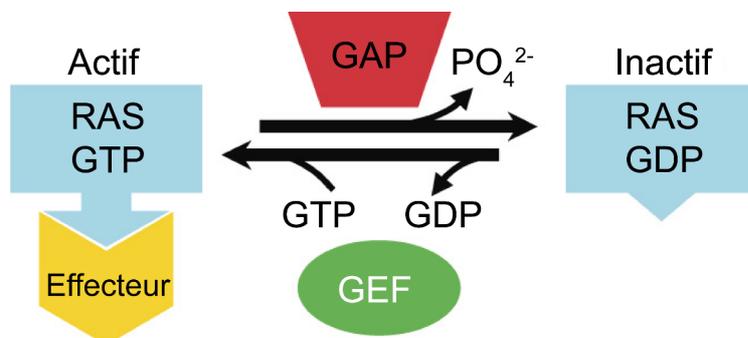


Figure 26 : Cycle d'activation des petites GTPases.

Les petites GTPases existent dans un état d'équilibre entre une forme liée au GDP et une forme liée au GTP. GEFs et GAPs régulent les proportions de chacune de ces formes. Les GEFs stimulent l'échange du GDP en GTP, tandis que les GAPs stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP. Les GTPases sous leur forme GTP présentent de fortes affinités pour leurs effecteurs, permettant la transmission de signaux. Adapté de (Cherfils and Zeghouf, 2013).

iii) Principales fonctions des petites GTPases

A chaque famille de petites GTPases est associée une fonction cellulaire. Les protéines de la famille Ras sont impliquées dans la prolifération et la croissance cellulaire. Les protéines de la famille Rho régulent l'organisation du cytosquelette, la motilité et l'invasion (Heasman and Ridley, 2008; Wennerberg et al., 2005). Les principales protéines de cette famille sont Rho, Rac et Cdc42 (dont l'implication dans les phénomènes d'endocytose a déjà été détaillée auparavant). La famille Ran est impliquée dans la translocation des ARN messagers et des protéines entre noyau et cytosol à travers les pores nucléaires. On ne dénombre chez l'Homme qu'une seule protéine Ran (Clarke and Zhang, 2008; Scheffzek et al., 1995). Les protéines de la famille Arf orchestrent le trafic vésiculaire et le métabolisme des phospholipides (Burd et al., 2004; Kahn et al., 2006). Les principaux membres de cette famille sont les protéines Arf1-6, Arfs-like et SAR. Enfin les protéines de la famille Rabs sont impliquées dans le trafic membranaire et assurent l'identité des différents compartiments intracellulaires.

Nous allons maintenant rentrer plus en détail dans la description de cette famille.

b) Rabs et trafic vésiculaire :

Les cellules de mammifères sont composées de plusieurs organelles membranaires qui permettent la coexistence au sein de la même cellule d'environnements chimiques isolés. La communication et les échanges de matériel entre chaque compartiment sont assurés par un système de transport tubulo-vésiculaire (vésicules d'environ 40 à 80 nm de diamètre). La sélection des régions membranaires à échanger se fait via des manteaux et complexes protéiques reconnus spécifiquement dans le cytosol. La déformation de ces régions donne ensuite naissance à une vésicule de transport (Figure 27) (Bonifacino and Glick, 2004; Faini et al., 2013).

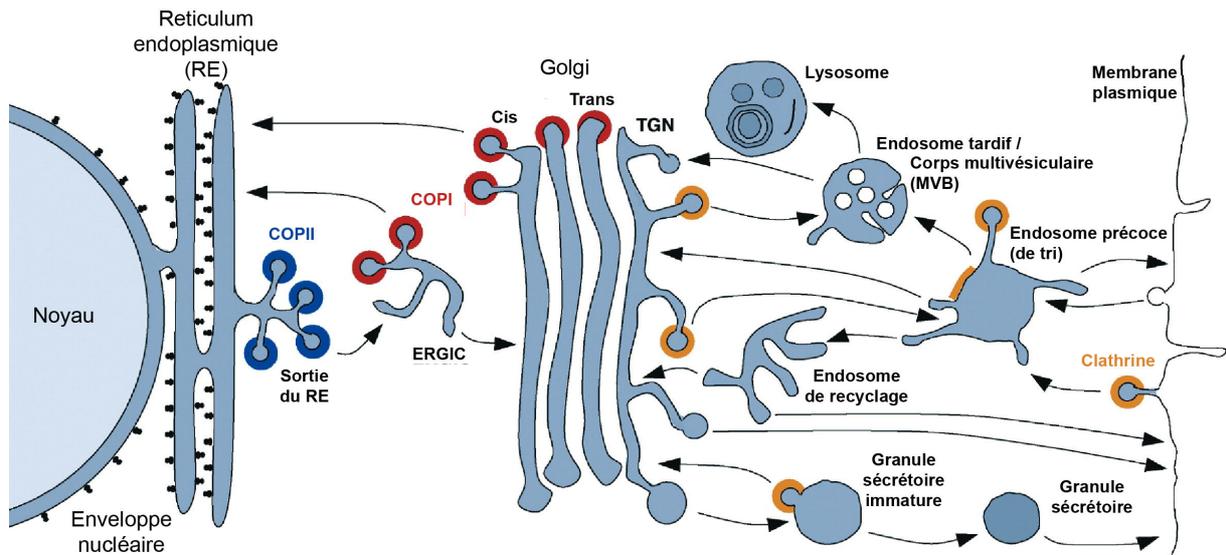


Figure 27 : Vue d'ensemble du trafic vésiculaire dans une cellule de mammifère.

Le schéma représente les compartiments des voies lysosomale, d'endocytose et de sécrétion. Les étapes de transport sont symbolisées par des flèches. Les couleurs représentent la localisation des principaux manteaux protéiques : COPII (bleu), COPI (rouge) et la clathrine (orange). Les manteaux de clathrine sont hétérogènes et contiennent différentes protéines accessoires au niveau de différentes membranes. Les fonctions les mieux connues sont celles de COPII dans l'export du réticulum endoplasmique et de la clathrine dans l'endocytose dépendante de la clathrine. En revanche les fonctions de COPI au niveau du compartiment intermédiaire entre réticulum endoplasmique et Golgi (ERGIC pour Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment) et du Golgi, ainsi que les fonctions de la clathrine au niveau du TGN, endosomes précoces et granules de sécrétion immatures sont beaucoup moins bien documentées. Le mécanisme d'acheminement au travers de l'appareil de Golgi est toujours un domaine de recherche très actif. Il semblerait que ce transport soit une combinaison de transport vésiculaire dépendant de COPI et de maturation des citernes. Adapté de (Bonifacino and Glick, 2004)

Une fois formées, les vésicules doivent être identifiées et adressées correctement à leur compartiment accepteur (Zerial and McBride, 2001).

Les protéines Rabs contribuent à définir l'identité de chaque compartiment et agissent en amont de nombreuses protéines, comme la famille des SNAREs (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). Les SNAREs, ainsi que d'autres facteurs, ont une place importante dans les événements de fusion entre vésicules et compartiments accepteurs (McNew et al., 2000; Shi et al., 2012).

i) Les protéines Rabs

Les Rabs GTPases furent associées pour la première fois au transport vésiculaire lors de l'analyse de mutants chez la levure. En effet, ces mutants possédaient un système de sécrétion défectueux, lié à l'absence de la protéine Sec4, orthologue de

Rab8 chez l'Homme (Novick et al., 1980; Salminen and Novick, 1987). De nombreuses autres Rabs ont été identifiées consécutivement à cette découverte (Touchot et al., 1987; Zahraoui et al., 1989). Rapidement, les Rabs ont été considérées comme des marqueurs moléculaires des différents compartiments membranaires de la cellule (Chavrier et al., 1990). A ce jour, 66 Rabs ont été identifiées chez l'Homme, la fonction de certaines n'étant toutefois toujours pas décrite (Figure 28).

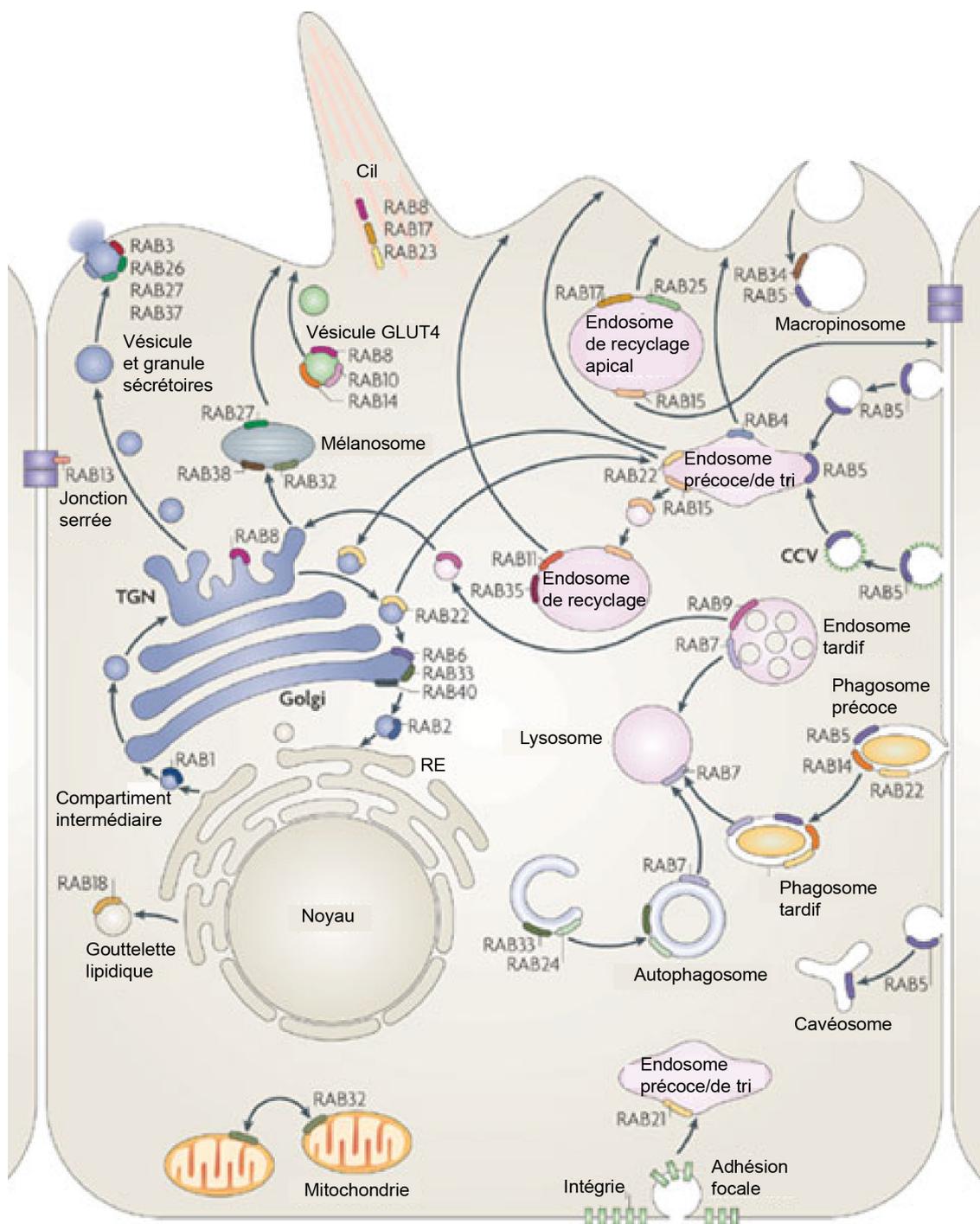


Figure 28 : Présentation globale de l'implication des Rabs dans l'identité des compartiments membranaires et dans le trafic intracellulaire (représentation d'une cellule épithéliale).

Rab1 est localisée au niveau des sites de sortie du réticulum endoplasmique et du compartiment intermédiaire pré-golgien, où est localisée Rab2. Elles interviennent dans le transport entre réticulum et Golgi. Rab 6, 33 et 40 régulent le trafic intra-Golgi. Rab33, avec Rab24, est également impliquée dans la formation des autophagosomes. Rab8 joue un rôle dans le transport constitutif entre le TGN et la membrane plasmique, participe à la translocation des vésicules GLUT4 (avec Rab10 et Rab14) et intervient dans la ciliogenèse (avec Rab17 et Rab23). Rab 3, 26, 27 et 37 régulent différents événements d'exocytose ; Rab27 est également impliquée dans le transport des mélanosomes vers la périphérie. Rab32 et Rab38 jouent un rôle dans la biogenèse des mélanosomes. Rab32 contrôle également la fission des mitochondries. Rab13 régule l'assemblage et le recyclage des jonctions serrées des cellules épithéliales. Rab18 contrôle la formation des gouttelettes lipidiques. Rab22 est impliquée dans le transport bidirectionnel entre TGN et endosomes précoces. Rab5 est localisée au niveau des endosomes précoces, phagosomes, cavésomes ; elle contrôle la fusion des CCVs, la macropinocytose (avec Rab34) et la maturation des phagosomes précoces (avec Rab 14 et 22). Rab21 régule l'endocytose des intégrines. Rab 4,11 et 35 régulent différentes voies de recyclage (lente ou rapide) partant des endosomes de recyclage, ou directement des endosomes précoces, en direction de la membrane plasmique. Rab15 est associée au trafic entre endosomes précoces et endosomes de recyclage et au trafic des endosomes de recyclage vers la membrane plasmique basolatérale. Rab17 et Rab25 contrôlent le transport des endosomes de recyclage apicaux vers la membrane plasmique apicale. Rab7 est associée aux endosomes tardifs et régule la maturation des endosomes et phagosomes ainsi que leur fusion avec les lysosomes. Rab9, une autre Rab associée aux endosomes tardifs, est impliquée dans le trafic entre endosomes tardifs et TGN. Adapté de (Stenmark, 2009).

Une fois activée, chaque Rab est capable de recruter des effecteurs à la surface des différents compartiments membranaires. Ces effecteurs peuvent intervenir dans la formation de vésicule de transport, lier des moteurs moléculaires, être impliqués dans la motilité vésiculaire ou encore reconnaître des protéines d'ancrage, facilitant ainsi l'adressage des vésicules à leurs compartiments cibles respectifs.

Les Rabs s'associent aux membranes via un ou deux groupements prényl qui sont attachés à une cystéine située en C-terminal de la protéine. Les facteurs GDIs reconnaissent les Rabs sous leur forme associée au GDP et permettent leur extraction des membranes, c'est pourquoi les Rabs inactifs sont principalement cytosoliques. L'adressage des Rabs aux différents compartiments de la cellule n'est pas encore clairement compris. Des études montrent que le simple adressage des GEFs au niveau de la mitochondrie permet de relocaliser les Rabs liées à ce facteur d'échange (Blumer et al., 2013; Gerondopoulos et al., 2012). Les GEFs semblent donc contribuer à la bonne localisation de chaque Rab dans son compartiment respectif, mais ne sont néanmoins pas suffisants pour effectuer cette tâche. Le

processus de modulation des Rabs par leurs GEFs et GAPs au bon endroit et au bon moment reste donc un large champs d'investigation (Barr and Lambright, 2010). En revanche, certaines études concernant la cinétique d'action des Rabs ont démontré qu'une Rab activée peut recruter le GEF d'une autre Rab voisine et ainsi agir en cascade (Kinchen and Ravichandran, 2010; Nordmann et al., 2010; Ortiz et al., 2002; Pusapati et al., 2012). A l'inverse le recrutement de GAPs permet de conserver une bonne ségrégation des compartiments (Figure 29).

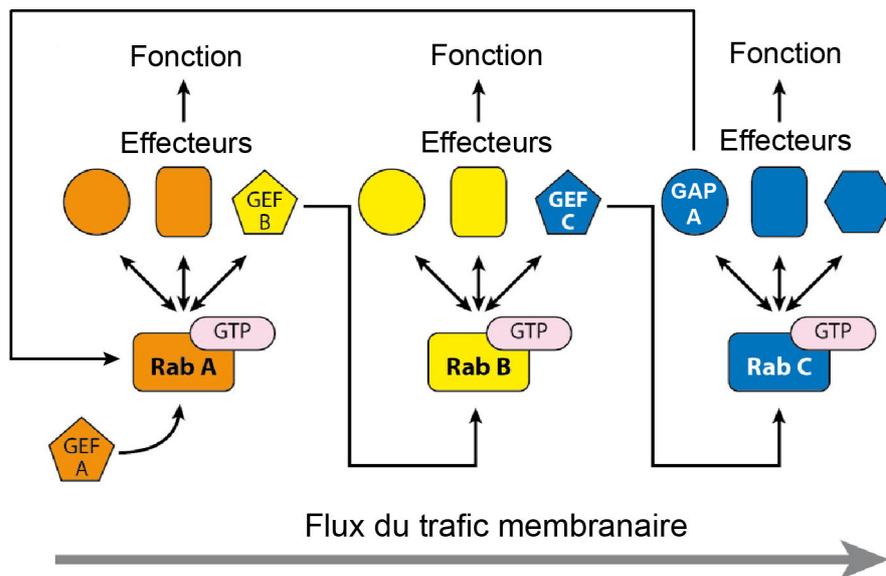


Figure 29 : Schéma d'activation en cascade des Rabs.

Rab A, activée par son GEF (GEFA), active ses effecteurs, dont GEF B fait partie. GEF B va activer Rab B qui va alors recruter ses effecteurs. Parmi eux est retrouvé GEF C, qui va activer Rab C. Rab C recrute à son tour ses effecteurs incluant GAP A, qui va inactiver Rab A et permettre d'arrêter l'activation en cascade. Il est à noter que d'autres modes d'activation existent, comme 2 Rabs partageant le même GEF ou une Rab recrutant son propre GEF pour créer une boucle d'amplification positive. Adapté de (Mizuno-Yamasaki et al., 2012).

La très grande sensibilité de ce système de régulation provient de l'action ciblée des GEFs et GAPs, qui sont spécifiques d'une seule Rab ou d'un groupe de Rabs (Delprato et al., 2004; Ioannou et al., 2015; Yoshimura et al., 2010). Les mécanismes précis d'activation, maturation, inactivation restent inconnus de nos jours, car très complexes à analyser. Mais il est évident que toute cette machinerie possède un système de régulation gigantesque, permettant par exemple d'éviter que GEF et GAP d'un même Rab ne soit en conflit d'interaction au même endroit, ce qui n'a aucun intérêt au niveau énergétique pour la cellule.

Les Rabs agissent donc en amont de nombreux effecteurs, comme les SNAREs ou les moteurs moléculaires, auxquels nous allons maintenant nous intéresser.

ii) Les SNAREs

Les SNAREs, dont 38 ont été identifiées chez l'Homme, sont classées en deux groupes : celles présentes sur la membrane du compartiment cible, appelées t-SNAREs (target), et celles présentes sur la membrane de la vésicule de transport, appelées v-SNAREs. Il est à noter qu'une protéine peut être t-SNARE dans un événement de fusion donné et v-SNARE dans un autre, la classification n'étant pas exclusive. Les principales protéines SNAREs connues sont celles des familles Vamp, syntaxine et SNAP. Elles possèdent toutes un ou deux motifs SNARE (Figure 30).

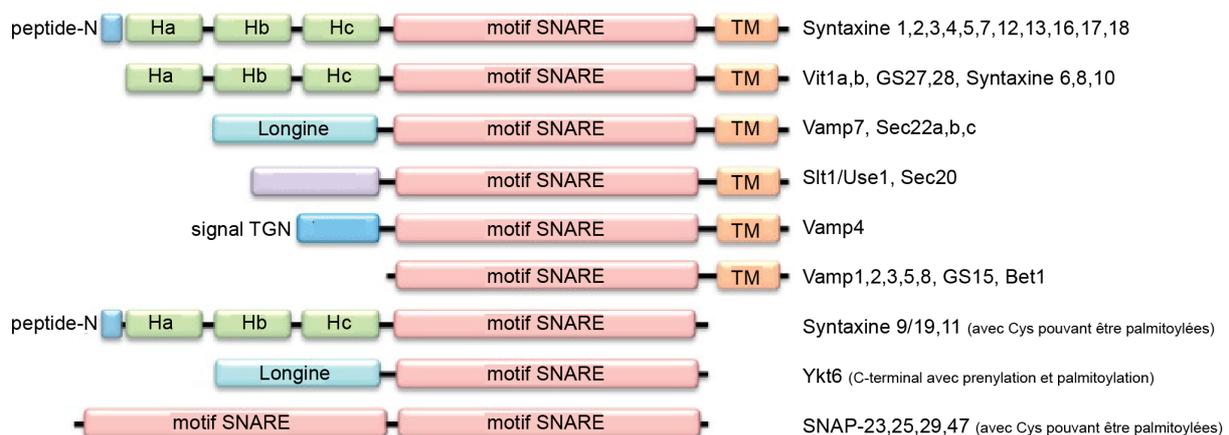


Figure 30 : Organisation des domaines des différentes protéines SNAREs.

Adapté de (Hong and Lev, 2014).

t-SNAREs et v-SNAREs forment un complexe, le complexe *trans*-SNARE. L'association de 4 motifs SNARE donne à ce complexe une conformation favorisant le rapprochement des deux membranes à fusionner (complexe *cis*-SNARE), puis elle catalyse la fusion membranaire (Chen and Scheller, 2001; Hanson et al., 1997). Une fois la fusion réalisée, les SNAREs restant sur les membranes fusionnées se désassemblent. Cette réaction est catalysée par une ATPase, appelée NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein), et son cofacteur SNAP (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein), ce qui permet le recyclage de SNAREs pour un nouveau cycle de fusion (Figure 33) (Jahn et al., 2003; Sollner et

al., 1993). En général, les couples v/t-SNARE ne sont pas spécifiques. Les possibilités d'associations sont multiples, ce qui permet leur implication dans un grand nombre d'évènements de fusion, tout en préservant une spécificité d'action (Hong, 2005; Malsam et al., 2008). La fusion membranaire a été un phénomène largement décrit par le Dr James E. Rothman. Ses importants travaux ont été récompensés en 2013 par un prix Nobel partagé avec les Dr Thomas Südhof et Randy Shekman (Bonifacino, 2014; Pfeffer, 2013; Rothman, 2014).

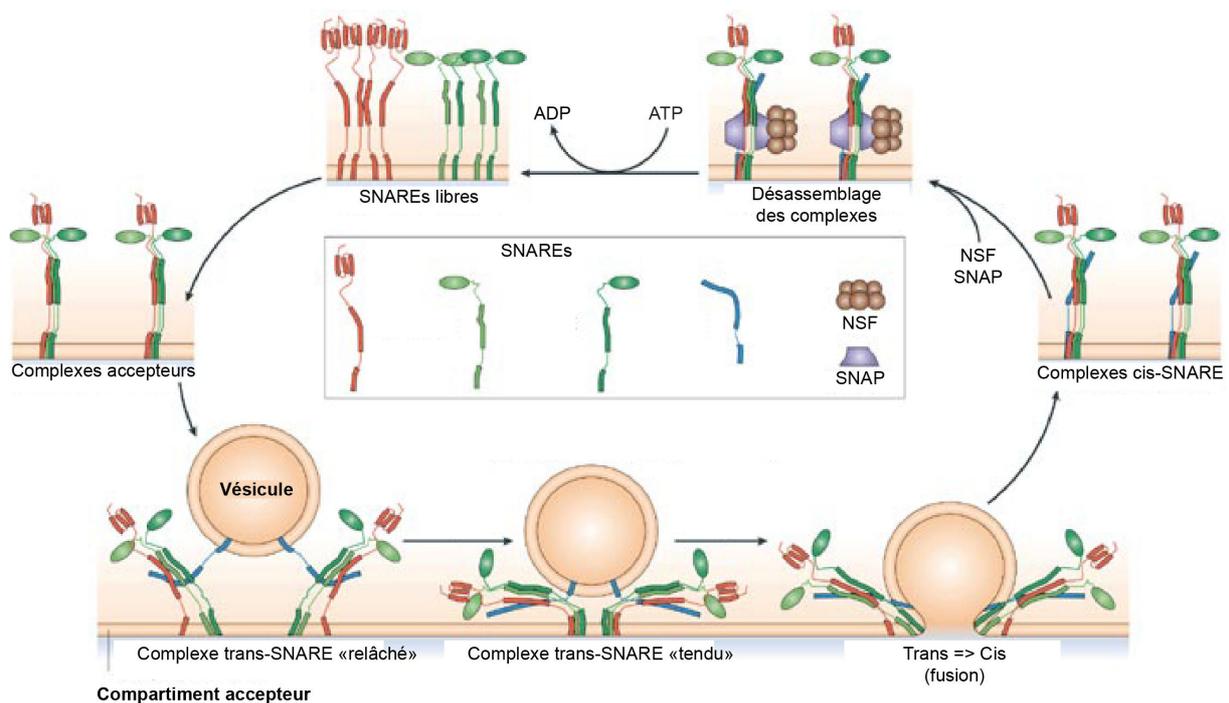


Figure 31 : Mécanisme d'action des SNAREs.

Les SNAREs sont organisées en petits groupes et s'assemblent pour former un complexe accepteur. Cet assemblage peut nécessiter l'intervention de protéines. Ce complexe interagit avec la v-SNARE et forme le complexe trans. Le complexe trans passe d'un état relâché à tendu, ce qui est suivi par l'ouverture du pore de fusion. Durant la fusion, le complexe trans se relâche dans une conformation appelée cis. Ce dernier est désassemblé grâce à l'ATPase NSF et aux protéines SNAPs. Les différentes SNAREs sont ensuite séparées par des mécanismes de tri. Adapté de (Jahn and Scheller, 2006).

iii) Facteurs d'attache

Le processus d'attachement des membranes, lors de leur rapprochement, fait appel à de larges molécules effectuant la liaison entre les membranes (Gillingham and Munro, 2003). Ces facteurs peuvent être divisés en deux groupes : les protéines homodimériques à long domaine en hélice α et les complexes d'attache à plusieurs

sous-unités (MTCs). Beaucoup de protéines homodimériques à long domaine en hélice α appartiennent à la famille des golgines (GM130, Golgine-45, Golgine-97, Golgine-245, p115...) et sont localisées au niveau de l'appareil de Golgi. D'autres protéines telles qu'EEA1 (early endosome antigen 1), Rabaptine-5 et Rabénosyne-5 sont localisées au niveau des compartiments endosomaux.

Les MTCs sont eux composés de 3 à 10 sous-unités et ont des poids moléculaires compris entre 250 et 800 kDa. Ils peuvent être divisés en deux classes majeures : CATCHR (complexes associated with tethering containing helical rods) et les complexes Vps (vacuolar protein-sorting) de classe C. La famille CATCHR comprend l'exocyste, DSL1, COG (conserved oligomeric Golgi) et GARP (Golgi-associated retrograde protein) et la famille des complexes Vps de classe C réunit HOPS et CORVET (class C core vacuole/endosome tethering) (Figure 37).

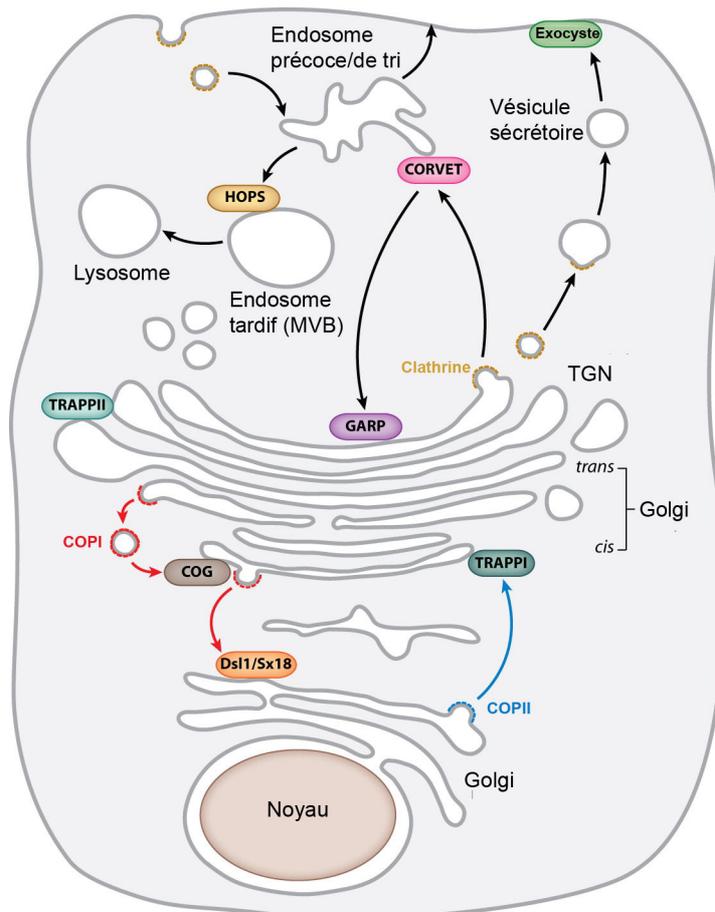


Figure 32 : Vue globale des MTCs.

Localisation des 8 principaux MTCs : Complexe Sx18 (Syntaxine 18) (appelé Dsl1 chez la levure), COG (Conserved oligomeric Golgi complex), CORVET (Class C core vacuole/endosome tethering complex), ERGIC (endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment), GARP (Golgi-associated retrograde protein complex), HOPS (Homotypic fusion and vacuole protein sorting) et TRAPP (Transport protein particle). Adapté de (Yu and Hughson, 2010).

Toutes ces protéines et tous ces complexes sont régulés par les petites GTPases des familles Rab et Arf (Barr and Short, 2003; Goud and Gleeson, 2010; Yu and Hughson, 2010). L'adressage des facteurs d'attache aux différents compartiments intracellulaires se fait par des motifs d'adressage spécifiques, des interactions avec des phospholipides ou encore des interactions avec des petites GTPases.

Nous reviendrons plus en détail sur la fonction de certains de ces facteurs/complexes et sur leur implication dans le trafic intracellulaire.

Combinés ensemble, Rabs (et Arfs), SNAREs et facteurs d'attache permettent une régulation des échanges membranaires dans la cellule (Figure 33).

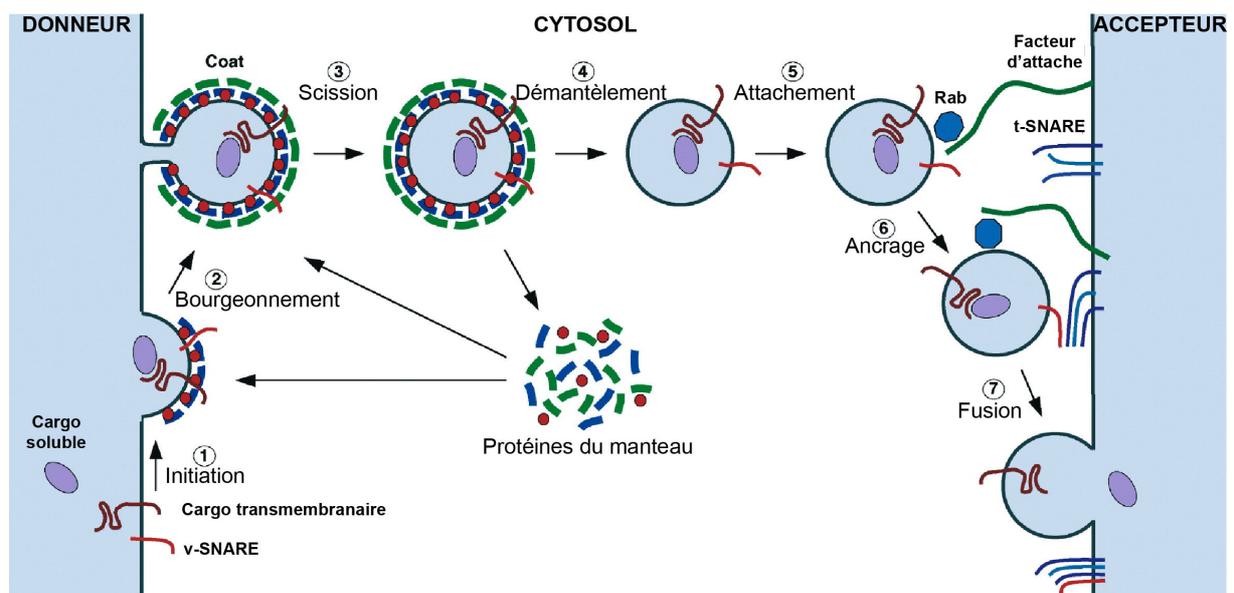


Figure 33 : Résumé général du trafic vésiculaire d'un compartiment donneur à son compartiment cible.

(1) Initiation de l'assemblage du manteau. Les composants (bleu) du manteau sont recrutés au niveau du compartiment donneur par liaison avec une GTPase (rouge) associée à la membrane et/ou un phosphoinositide spécifique. Les cargos transmembranaires et les SNAREs commencent également à se rassembler au niveau du manteau en cours de formation. (2) Bourgeonnement. Les composants distaux du manteau (vert) s'ajoutent à la structure et polymérisent formant un maillage. (3) Scission. Le cou, compris entre la vésicule et le compartiment donneur, est coupé par action du manteau ou par des protéines accessoires. (4) Démantèlement. La perte du manteau est causée par l'inactivation des

petites GTPases, l'hydrolyse de phosphoinositides et l'action d'enzyme de démantèlement. Les composants du manteau sont alors cytosoliques et sont recyclés dans un autre procédé de formation de vésicule. (5) Attachement. La vésicule dénuée de manteau approche de son compartiment accepteur, probablement guidée par le cytosquelette, et se lie à ce compartiment grâce à la combinaison d'une Rab activée et de facteurs d'attache. (6) Ancrage. Les SNAREs s'assemblent pour former le complexe trans. (7) Ce complexe stimule la fusion des bicouches lipidiques de la vésicule et du compartiment accepteur. Le cargo est transféré au compartiment accepteur et les SNAREs sont recyclées. Adapté de (Bonifacino and Glick, 2004).

C'est ainsi que des cargos internalisés par endocytose vont, dans un premier temps, atteindre les endosomes précoces. Ces derniers sont des compartiments qui constituent de vastes plateformes de tri, mais aussi de signalisation. Les cargos vont y être concentrés au niveau de microdomaines, qui détermineront leur adressage. Nous allons maintenant nous intéresser à ces compartiments et aux différents scénarios envisageables pour les molécules internalisées par endocytose.

c) Endosomes précoces, plateformes de tri et de signalisation

Les endosomes précoces (EP) ont été initialement décrits comme étant le premier compartiment recevant les cargos et fluides internalisés. De nos jours, ils sont considérés comme de véritables plateformes de tri des voies d'endocytose (dépendante et indépendante de la clathrine). L'origine de ces compartiments n'est pas clairement identifiée, mais il semblerait qu'ils dérivent de la fusion de plusieurs vésicules primaires d'endocytose. Plusieurs protéines présentes dans le cytosol sont associées aux endosomes précoces. La petite GTPase Rab5 est un des marqueurs identifiant les EP. L'un de ses effecteurs, un complexe de la PI3K (Vps34/p150), a également une place importante car il génère le PI(3)P qui contribue à l'identité des EP (Christoforidis et al., 1999). Les endosomes précoces sont hétérogènes en terme de morphologie, localisation, composition et fonction mais la majorité d'entre eux sont de petite taille et localisés à la périphérie de la cellule, proche de la membrane plasmique (Lakadamyali et al., 2006; Miaczynska et al., 2004; van Meel and Klumperman, 2008). Leur distribution globale dépend du type cellulaire. Considérés individuellement, les endosomes précoces présentent une ultrastructure avec des domaines vacuolaires et tubulaires (Figure 34).

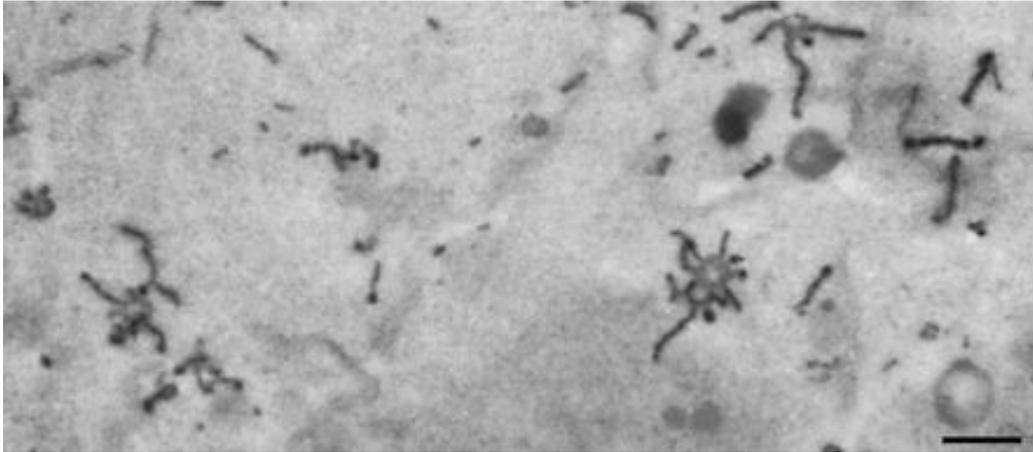


Figure 34 : Structure des endosomes précoces.

Photo de microscopie électronique d'endosomes précoces périphériques contenant de la transferrine conjuguée à la HRP. Le couplage avec la HRP permet de mettre en évidence la structure tubulaire des compartiments précoces ainsi que la partie vacuolaire. Barre d'échelle 500 nm. Adapté de (Huotari and Helenius, 2011).

La plus grande partie de la surface de la structure est située au niveau des tubules, tandis que la plus grande partie du volume est retrouvée au niveau des vacuoles. La membrane limitante des endosomes précoces contient une mosaïque de sous-domaines de différentes compositions, leur procurant des fonctions spécifiques. Sont présents par exemple des microdomaines enrichis en Rab5, Rab4, Rab11, Arf1/COPI, rétromère (Zerial and McBride, 2001). Ces microdomaines procurent à l'endosome précoce sa fonction de tri moléculaire par génération de vésicules de transport, qui peuvent être adressées à différentes organelles comme la membrane plasmique, les endosomes de recyclage, les endosomes tardifs et lysosomes ou encore le TGN (Bonifacino and Rojas, 2006; Grant and Donaldson, 2009). Les molécules comprises dans la partie vacuolaire des endosomes précoces, quant à elles, vont voir leur environnement chimique modifié, grâce aux échanges continus entre ces compartiments et le TGN. Ces échanges sont notamment régulés par des protéines comme Rab7a, Rab7b, Rab9 ou le complexe appelé rétromère. Ce sont ces échanges qui permettent la maturation de l'endosome précoce en endosome tardif (ou corps multivésiculaire), en apportant des composants favorable à la maturation d'une part, en retirant des composants caractéristiques de l'endosome précoce d'autre part (Bonifacino and Hurley, 2008; Pfeffer, 2009; Progida et al., 2010). Ces cargos suivront une voie les menant finalement à leur dégradation (Figure 35).

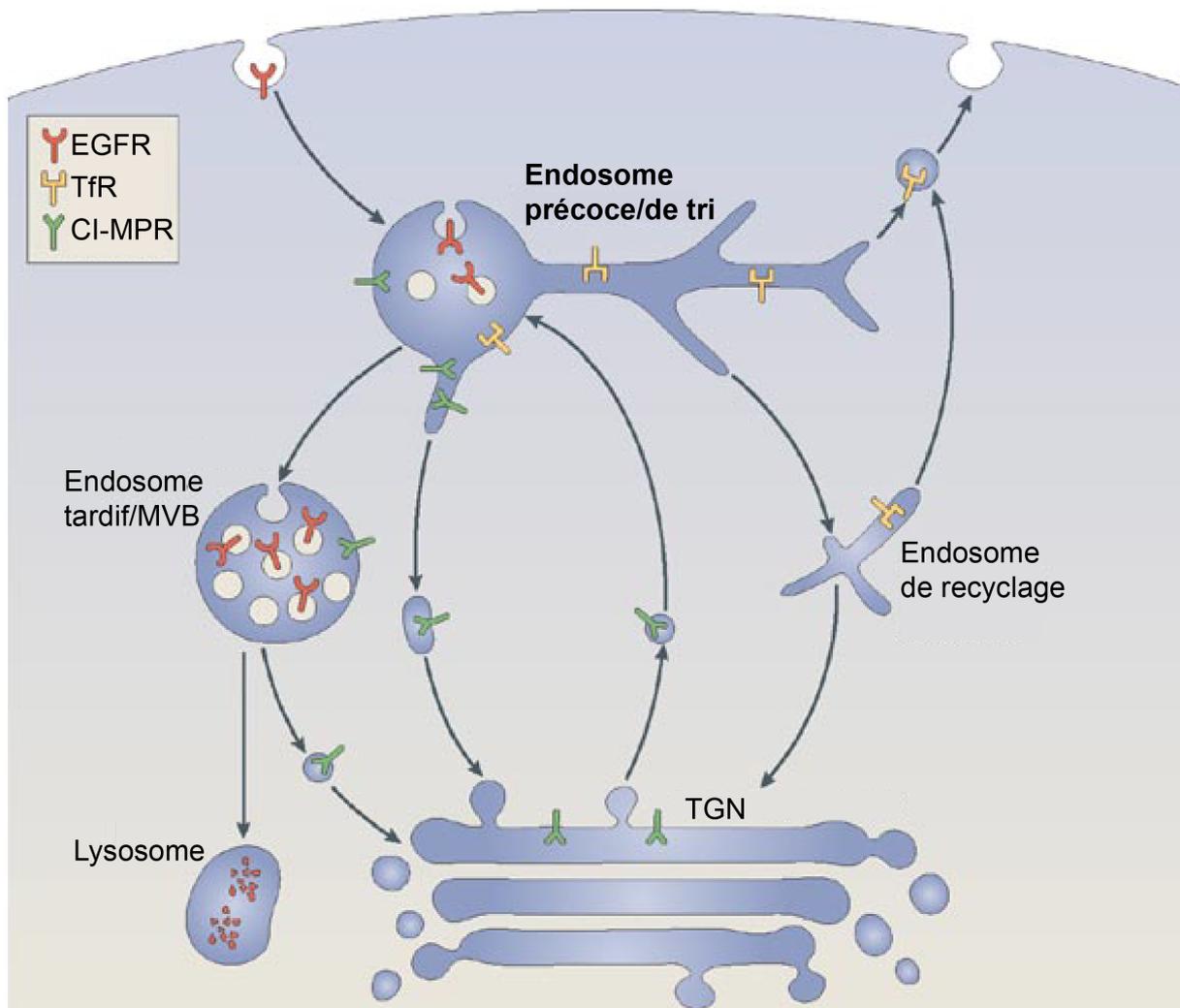


Figure 35 : Tri et adressage sélectif de cargos.

Les différents cargos internalisés sont adressés vers différentes voies. Sont présentés ici des cargos dits « modèles » car empruntant tous majoritairement une voie spécifique. Le récepteur à l'EGF (EGFR) suit la voie de dégradation, tandis que le récepteur à la transferrine (TfR) est recyclé à la membrane plasmique. Enfin le récepteur au mannose 6-phosphate cation-indépendant (CI-MPR) cycle entre endosome et TGN. Adapté de (Cullen, 2008).

d) La voie de dégradation

Cette voie correspond à la maturation de l'endosome précoce en endosome tardif, ou corps multivésiculaire. Les endosomes tardifs dérivent donc directement des domaines vacuolaires des endosomes précoces. Leur lumen contient des ligands dissociés de leur récepteur, ainsi que des protéines et solutés internalisés présents dans le fluide. Des vésicules intraluminales, générées par les complexes ESCRT (endosomal sorting complexes required for sorting), sont également retrouvées dans la partie vacuaire (c'est également dans la partie vacuaire que sont retrouvés certains virus entrant dans la cellule).

i) Les complexes ESCRT

Les complexes ESCRT comptent plus de 30 protéines, qui sont impliquées dans une série d'évènements essentiels pour la fission de membranes. Parmi les fonctions principales de ces complexes, on retrouve le bourgeonnement de virus et vésicules à la membrane plasmique, l'abscission lors de la cytokinèse, mais surtout la formation de vésicules intraluminales au niveau des endosomes (Katzmann et al., 2001). À la différence de la fission de vésicules dans l'endocytose par la dynamine, qui a lieu au niveau de l'extérieur du cou formé, la fission a ici toujours lieu du côté cytoplasmique, au niveau de fins tubules préalablement formés. La machinerie ESCRT est, en quelque sorte, un complexe de fission inversée. L'existence de ce complexe fut mise en évidence lors de l'observation de vésicules situées elles-mêmes à l'intérieur d'autres vésicules (les ILVs dans les MVBs). Les composants du complexe ESCRT ont ensuite rapidement été identifiés et sous-classés en plusieurs complexes, appelés ESCRT -0, -I, -II, -III et Vps4 AAA ATPase. Chaque complexe possède des propriétés biochimiques particulières. Nous ne détaillerons que l'implication de ces complexes dans la formation des vésicules intraluminales des corps multivésiculaires.

Le complexe ESCRT-0, composé d'hétérodimères de protéines Hrs et STAM, permet la reconnaissance des cargos ubiquitinés qui vont être incorporés dans les ILVs (Bache et al., 2003). L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle, qui permet au complexe ESCRT-0 de reconnaître, sélectionner et concentrer les cargos portant cette marque, via des domaines UBD (ubiquitin-binding domain). Ce processus a lieu au niveau de microdomaines membranaires, d'où naissent les vésicules. Certaines études ont démontré que le complexe ESCRT-0 peut également s'associer avec certains cargos non ubiquitinés (Yamashita et al., 2008). L'ubiquitination n'est donc pas un facteur obligatoire de sélection pour le complexe ESCRT. Le complexe ESCRT-0 facilite également la courbure de la membrane en interagissant directement avec le PI(3)P présent sur les endosomes, via un domaine FYVE (Raiborg et al., 2001). Enfin, il recrute le complexe ESCRT-I en liant la sous-unité Tsg101 de ce dernier et interagit également avec la protéine Eps15b, protéine importante pour la dégradation de récepteurs (Roxrud et al., 2008). Le complexe ESCRT-I est composé des protéines Tsg101, Vps28, Vps37 et MVB12 et peut lier à la fois ESCRT-II et ESCRT-0, les ubiquitines et la protéine ALIX (Kostelansky et al.,

2007). Dans la voie canonique, ESCRT-I recrute ESCRT-II et, ensemble, ils créent ou stabilisent le cou de la future vésicule (Wollert and Hurley, 2010). ESCRT-II connecte ESCRT-I et ESCRT-III. C'est un hétérotétramère composé de Vps36, Vps22 et deux Vps25 (Babst et al., 2002b; Teo et al., 2004). Une étude suggère aussi que ce complexe via son interaction avec la protéine RILP, capable elle-même d'interagir avec des moteurs moléculaires, pourrait connecter les MVBs aux microtubules (Progida et al., 2007).

Le complexe ESCRT-III est différent des trois précédents. Il est composé de protéines monomériques solubles, qui polymérisent sous forme de filaments lors de leur recrutement à la membrane, via des interactions avec des composants des autres complexes (Babst et al., 2002a). Enfin ESCRT-III recrute Vps4, une ATPase AAA+ fonctionnant en dodécamère en forme d'anneau pour désassembler progressivement le complexe ESCRT-III (Figure 38). Le mécanisme sous-jacent à la polymérisation des sous-unités du complexe ESCRT-III, puis à la constriction membranaire, ensuite à la formation d'un cou, enfin à la fission finale de la vésicule, reste encore obscur.

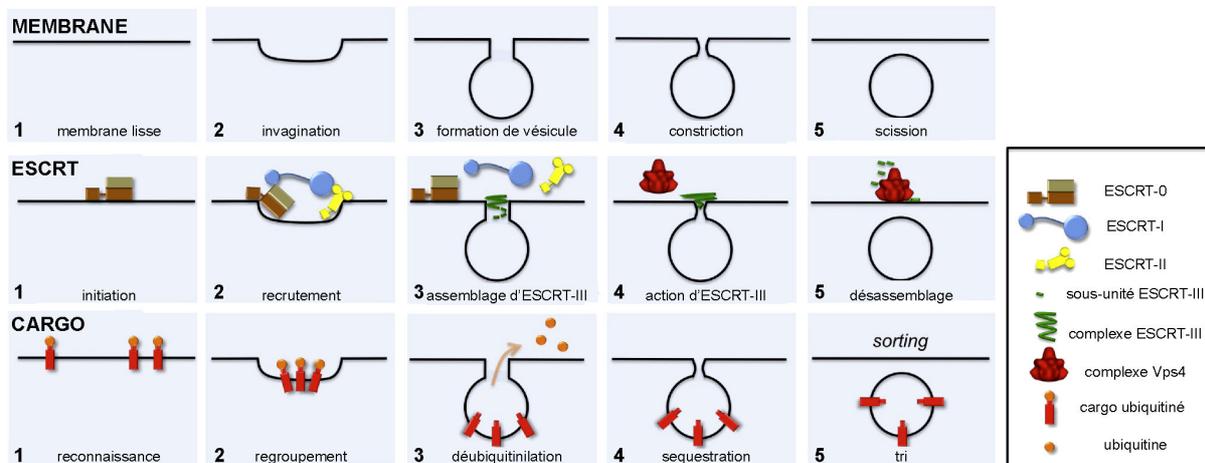


Figure 36 : Formation des ILVs.

Le panneau supérieur se concentre sur les étapes de déformation membranaire, qui se produit pendant la formation des ILVs. Une membrane plane (1) s'invagine (2) puis mature en une vésicule qui est toujours attachée au niveau d'un cou (3). Le cou peut subir une constriction (4) suivie d'une fission (5) pour finaliser le processus de formation de la vésicule. Le panneau central se place au niveau des protéines ESCRT. ESCRT-0 initie le mécanisme en reconnaissant les cargos ubiquitinés (1). ESCRT-I et ESCRT-II s'associent aux cargos et entre eux pour former une zone enrichie en complexes (2). ESCRT-II stimule l'assemblage d'ESCRT-III (3), qui contrôle le bourgeonnement de la vésicule (4). Il est désassemblé par le complexe Vps4-Vta1 (5). Le panneau inférieur se focalise sur le cargo qui est tout d'abord reconnu par les domaines UBD d'ESCRT-0 (1) et groupé par les complexes ESCRT-0, -I et -II (2). L'assemblage d'ESCRT-III recrute la machinerie de désubiquitination (3) et

rassemble les cargos dans la vésicule en cours de maturation (4), avant d'être triés au moment du bourgeonnement (5). Adapté de (Henne et al., 2011).

ii) Conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs

Le signe majeur de cette conversion est la formation de domaines Rab7a (dans la suite du manuscrit j'utiliserai Rab7 pour me référer à Rab7a). Rab7 est recrutée par Rab5 sous sa forme active, ce qui génère de façon transitoire des endosomes hybrides contenant à la fois Rab5 et Rab7. Dans ce modèle de conversion, on assiste à un appauvrissement de Rab5 à mesure du recrutement de Rab7 (Rink et al., 2005).

Cependant, un autre modèle a été proposé dans lequel Rab5 recrute Rab7, faisant bourgeonner de l'endosome précoce des compartiments ne contenant que Rab7 (dépendant de la dynamine) (Mesaki et al., 2011; Vonderheit and Helenius, 2005). Dans les deux cas, les rôles de Rab5 et 7 sont centraux et, d'une façon générale, nous pouvons affirmer que les compartiments propres à chaque Rab s'assemblent les uns à côté des autres (Cabrera and Ungermann, 2010).

En parallèle de ce changement d'identité membranaire, Rab5 sous sa forme active a un autre effecteur : le MTC CORVET. Ce complexe permet la fusion homotypique des endosomes précoces, via le facteur d'attache EEA1 ; il leur procure le matériel membranaire nécessaire à la formation des MVBs.

iii) Maturation des endosomes tardifs

La maturation des endosomes tardifs a pour signature le changement de composants membranaires (conversion du PI(3)P en PI(3,5)P2 par l'enzyme PIKfyve), la migration des compartiments vers la région périnucléaire, le changement des partenaires de fusion, la chute progressive du pH luminal (de 6 à 4,9), l'acquisition de composants lysosomaux, le changement de morphologie et l'augmentation du nombre de vésicules intraluminales (Il est à noter que des ILVs sont déjà présentes au stade endosome précoce, mais en faible nombre ; par comparaison, un endosome tardif en contient souvent plus de 30). Une des fonctions des ILVs dans les MVBs serait de présenter les cargos membranaires sous une forme plus facilement digérée par les hydrolases.

Parmi les modifications subies par les endosomes tardifs, on retrouve - par exemple - l'acquisition de glycoprotéines membranaires à la membrane limitante du compartiment. L'une des plus caractéristiques est certainement la protéine Lamp1 (Lysosomal-associated membrane protein 1), qui confère une résistance aux hydrolases acides présentes dans le compartiment. La migration des compartiments vers la région périnucléaire permet leur rapprochement avec les lysosomes, facilitant la fusion homotypique des endosomes tardifs, mais aussi leur fusion avec les lysosomes. Ces fusions permettent aux endosomes tardifs d'acquérir des enzymes de dégradation (hydrolases acides par exemple), mais également de modifier leur environnement chimique, devenant plus acide. Ces fusions sont réalisées par un effecteur de Rab7 : le complexe HOPS. Ce complexe partage des sous-unités communes au complexe CORVET. Toutefois l'un et l'autre disposent tous deux de sous-unités qui leur sont propres, leur permettant ainsi d'agir à des niveaux distincts dans la cellule (Figure 37).

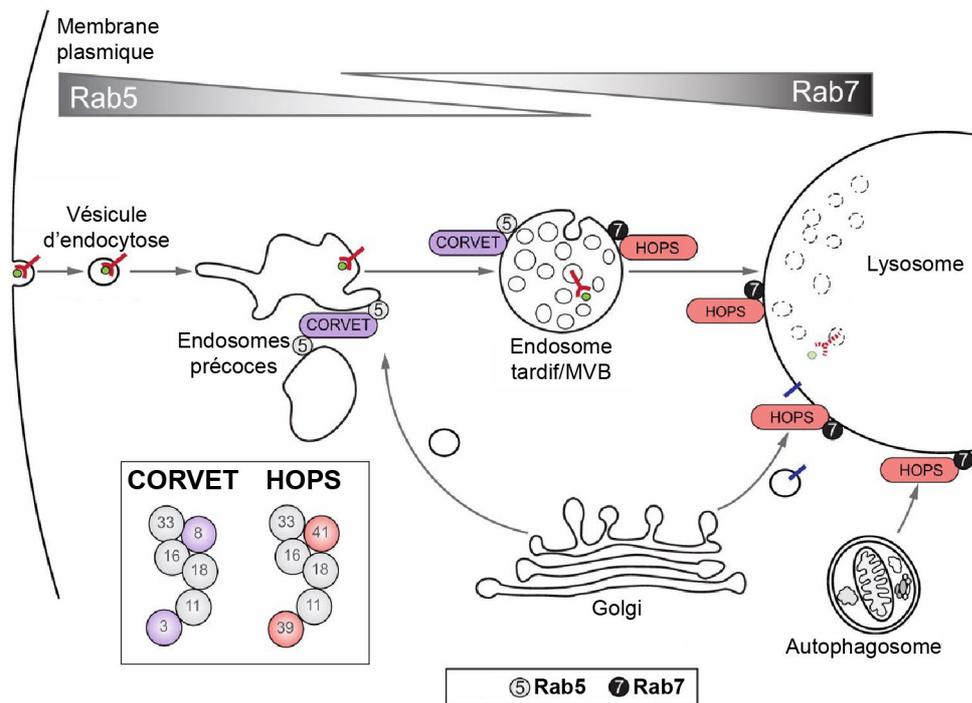


Figure 37 : Composition et spécificité des complexes CORVET et HOPS.

Ce schéma représente le devenir d'un ligand associé à son récepteur, passant par la voie d'endocytose avant leur éventuelle dégradation. Les vésicules d'endocytose sont attachées aux endosomes précoces grâce à des facteurs d'attache comme Vac1, EEA1 ou Rabénosyne5. La fonction du complexe CORVET, en association à Rab5, favorise la fusion endosome-endosome. Lorsque Rab5 est remplacée par Rab7 au cours de la maturation de l'endosome, c'est le complexe HOPS. Cet effecteur de Rab7 continue à promouvoir la fusion

entre endosomes, compartiments tardifs et lysosomes. Adapté de (Balderhaar and Ungermann, 2013).

La mise en place de toutes ces modifications dans la cellule a pour but d'arrêter les évènements de fission émanant des structures tubulaires des endosomes précoces et de favoriser la fusion des endosomes tardifs avec des compartiments facilitant la dégradation des cargos. Une conversion similaire a lieu au niveau des phagosomes, des autophagosomes et probablement des macropinosomes.

Le cargo de référence pour étudier cette voie est le récepteur à l'EGF. En effet, après liaison de son ligand, dimérisation et internalisation, le récepteur va transmettre des signaux dans la cellule aussi bien au niveau de la membrane plasmique que dans les endosomes. Afin de réguler ces signaux et d'éviter une trop forte stimulation de la cellule, le récepteur est ubiquitiné et intégré dans des ILVs, l'empêchant d'interagir avec des protéines du cytosol. L'acidification du compartiment va engendrer la dissociation du ligand, puis la fusion finale avec les lysosomes qui dégradent aussi bien le récepteur que son ligand. Ce n'est pas la seule voie que peut suivre le récepteur à l'EGF après son internalisation mais c'est celle qu'il emprunte majoritairement. La dégradation peut être plus ou moins importante selon la concentration de ligand utilisée (Figure 38).

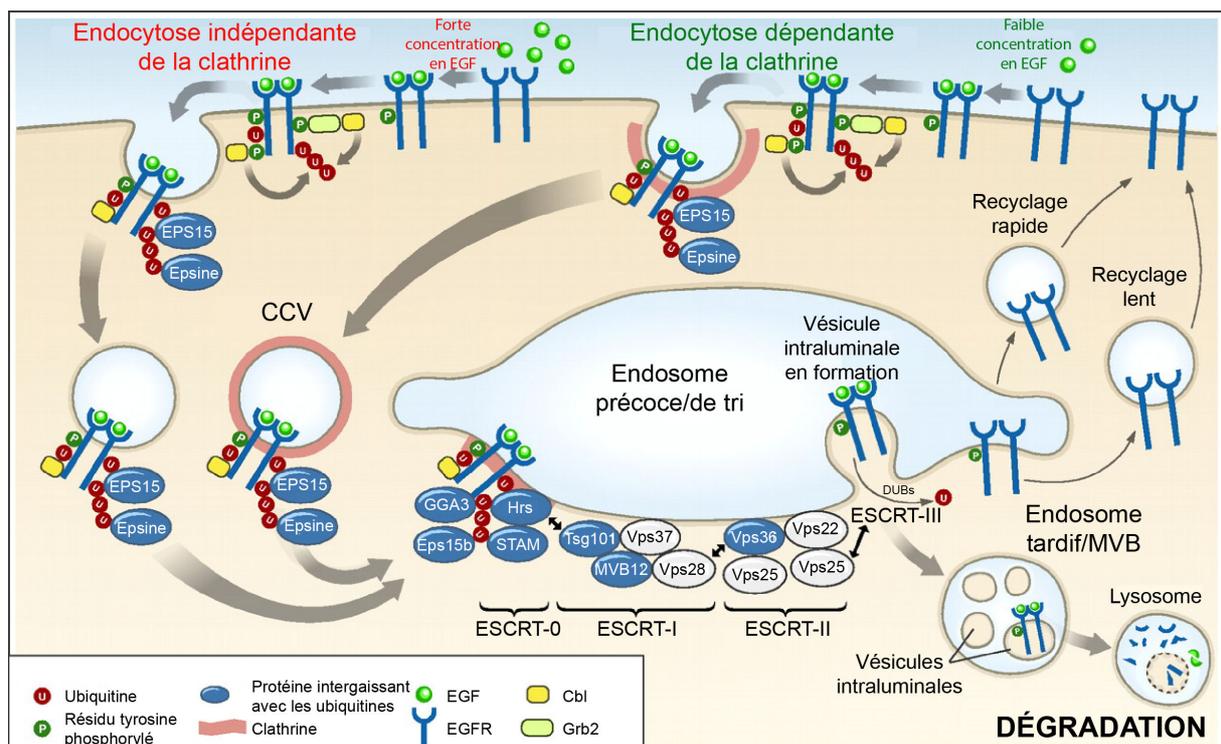


Figure 38 : Endocytose du récepteur à l'EGF.

Après liaison avec son récepteur, le récepteur à l'EGF (EGFR) est soumis aux mécanismes d'endocytose dépendant (coin supérieur droit) ou indépendant (coin supérieur gauche) de la clathrine. La voie d'endocytose empruntée dépend de la concentration en ligand utilisée. Dans tous les cas, les récepteurs sont adressés vers les endosomes précoces, d'où ils peuvent être envoyés dans des ILVs au niveau des MVBs pour finalement être dégradés au niveau des lysosomes (quand le récepteur est ubiquitiné) ; ils peuvent également être recyclés à la membrane plasmique (récepteur non-ubiquitiné). L'ubiquitine est donc un signal essentiel pour l'adressage du récepteur vers la voie de dégradation. Avant l'insertion du récepteur dans les ILVs, il est désubiquitiné sans pour autant pouvoir s'échapper de l'adressage auquel il est destiné. Adapté de (Haglund and Dikic, 2012).

e) Le transport rétrograde

Ce mécanisme correspond au transport de protéines depuis les endosomes vers le TGN. C'est une voie spécialisée qui n'est empruntée que par une faible partie des glycoprotéines de surface. Les principaux cargos d'étude de ce processus sont le récepteur au mannose 6-phosphate cation-indépendant (CI-MPR), la protéine TGN38, qui cycle entre les endosomes et le TGN (mais dont la fonction demeure inconnue), la furine, qui est une protéase, et les toxines Shiga (STx) et cholérique (CTx), qui rentrent dans la cellule et sont transportées des endosomes au réticulum endoplasmique en passant par le Golgi (Bonifacino and Rojas, 2006; Johannes and Popoff, 2008). Selon le cargo considéré, le chemin emprunté des endosomes précoces vers le TGN peut être différent.

i) Le transport des CI-MPRs

Le CI-MPR a pour fonction principale d'adresser les enzymes lysosomales synthétisées dans le réticulum endoplasmique. En effet, ces enzymes dégradatives ne doivent pas emprunter la voie sécrétoire une fois présentes dans le TGN. Pour éviter qu'elles ne se soient sécrétées, elles sont étiquetées avec un résidu mannose 6-phosphate qui est reconnu par les MPRs. Il existe deux formes de MPRs : un récepteur dépendant des cations Mn^{2+} , appelé CD-MPR, et un récepteur indépendant des cations, appelé CI-MPR. Tous deux fonctionnent en homodimères, et nous ne nous intéresserons ici qu'au CI-MPR. Le transport de ce récepteur des endosomes vers le TGN a longuement été débattu. L'hypothèse initiale s'orientait vers un transport direct des endosomes précoces vers le TGN (Arighi et al., 2004; Meyer et al., 2000; Seaman, 2004). Mais des études plus récentes ont montré

l'implication des petites GTPases Rab7b et Rab9 (marqueurs des endosomes tardifs), et celle de leurs effecteurs dans ce transport. Rab7b a aussi été rapportée comme importante pour le recrutement du complexe rétromère (Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009). De plus, et afin de se dissocier des enzymes qu'ils transportent, les CI-MPRs doivent être mis en présence d'un pH plus acide que celui des endosomes précoces (Griffiths et al., 1988; Tong and Kornfeld, 1989). Toutes ces données démontrent que, pour aller des endosomes précoces vers le TGN, les CI-MPRs passent par les endosomes tardifs. Ce chemin est également emprunté par la furine.

ii) Le transport des toxines bactériennes

Les toxines bactériennes (CTx et STx) emprunteraient une voie différente. En effet, leur transport vers le TGN est indépendant de Rab9. Initialement, une étude a démontré que la toxine Shiga, est adressée directement des endosomes précoces au TGN, sans transit intermédiaire (Mallard et al., 1998). Cependant ces dernières années, d'autres études ont montré que la Shiga toxine et d'autres toxines peuvent transiter par les endosomes de recyclage avant d'atteindre le TGN. La protéine TGN38, qui colocalise avec ces toxines au niveau des endosomes précoces, ne passerait par les endosomes de recyclage et serait directement adressée des endosomes précoces au TGN (Johannes and Wunder, 2011; Lieu et al., 2007; Lieu and Gleeson, 2010). Si les mécanismes de ces différents transports ne sont pas précisément connus, il est établi qu'un tri est effectué entre les toxines et les CI-MPR (et peut être même le TGN38). Il est proposé que ce tri a lieu au niveau des endosomes précoces. Le facteur commun de ces différentes voies du transport rétrograde est l'implication du rétromère (Figure 39). Cependant, ces derniers mois, une étude a démontré que le transport rétrograde ne serait pas nécessaire pour la translocation de la Shiga toxine, dans les cellules présentatrices d'antigènes (Garcia-Castillo et al., 2015).

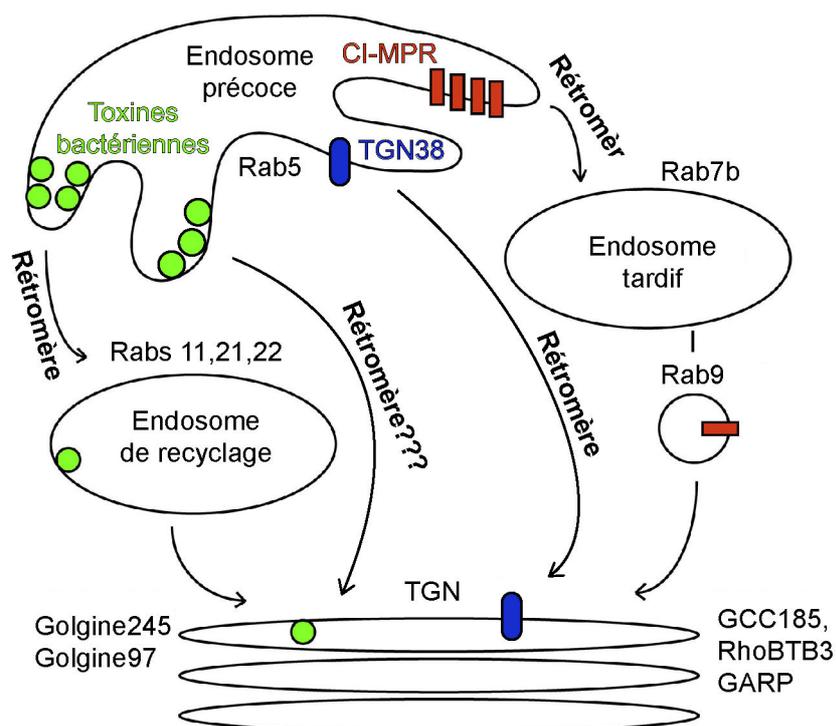


Figure 39 : Différentes voies du transport rétrograde.

Tous les cargos, CI-MPR, TGN38 et toxines bactériennes, sont présents au niveau des endosomes précoces et sont triés avant d'être convoyés vers le Golgi. Les toxines bactériennes transitent ou non par les endosomes de recyclage, avant d'être adressées au Golgi. Ce mécanisme implique majoritairement Rab11 mais pourrait aussi faire intervenir Rab 21 et 22. Le CI-MPR transite dans des compartiments tardifs, dépendamment de Rab 7 et 9. La molécule TGN38 est transportée directement des endosomes précoces au Golgi. Ces 3 voies d'adressage vers le Golgi font intervenir le rétromère. La seule étape commune étant la sortie des endosomes précoces, il est proposé que le rétromère facilite la sortie des cargos de ces compartiments. Adapté de (Pfeffer, 2009).

iii) Le rétromère

Ce complexe, identifié chez la levure, est composé de 5 sous-unités qui peuvent être séparées en 2 sous-groupes : le trimère Vps26, Vps29, Vps35, responsable de la reconnaissance des cargos, et le dimère Vps5, Vps17, impliqué dans la déformation membranaire (Seaman et al., 1997; Seaman et al., 1998). Chez les mammifères, le cœur du complexe (Vps26, Vps29 et Vps35) est conservé (Bachhawat et al., 1994; Edgar and Polak, 2000; Haft et al., 2000) ; cependant le complexe de déformation membranaire est différent de celui de la levure. En effet, celui-ci est composé de protéines de la famille des sorting nexins (SNX), lesquelles sont des protéines à domaine BAR. Elles fonctionnent en dimères et, dans le cas du rétromère, on retrouve les SNX1 ou SNX2 associées à la SNX5 ou SNX6, offrant ainsi au moins quatre combinaisons d'association (Wassmer et al., 2007; Wassmer et al., 2009). Il a

également été rapporté que le cœur du complexe peut être associé à la SNX3, suggérant l'existence de plusieurs complexes avec différentes fonctions. L'association avec la SNX3 a été mise en évidence dans la sélection et dans le tri spécifique du morphogène Wnt et de son récepteur Wntless, présent dans des compartiments dépourvus du CI-MPR. Ceci permet une bonne maintenance du gradient de Wnt en modulant le recyclage de Wntless (Harterink et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Le rétromère est également un effecteur de la petite GTPase Rab7, marqueur des endosomes tardifs. Cependant, les SNX qui composent le complexe interagissent avec le PI(3)P, préférentiellement retrouvé sur les endosomes précoces. Ce sont donc les proportions de Rab5 et Rab7 et des différentes SNX impliquées dans le complexe qui vont déterminer le moment où le rétromère va être recruté (au cours de maturation des endosomes précoces) (Figure 40) (Nakada-Tsukui et al., 2005; Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009).

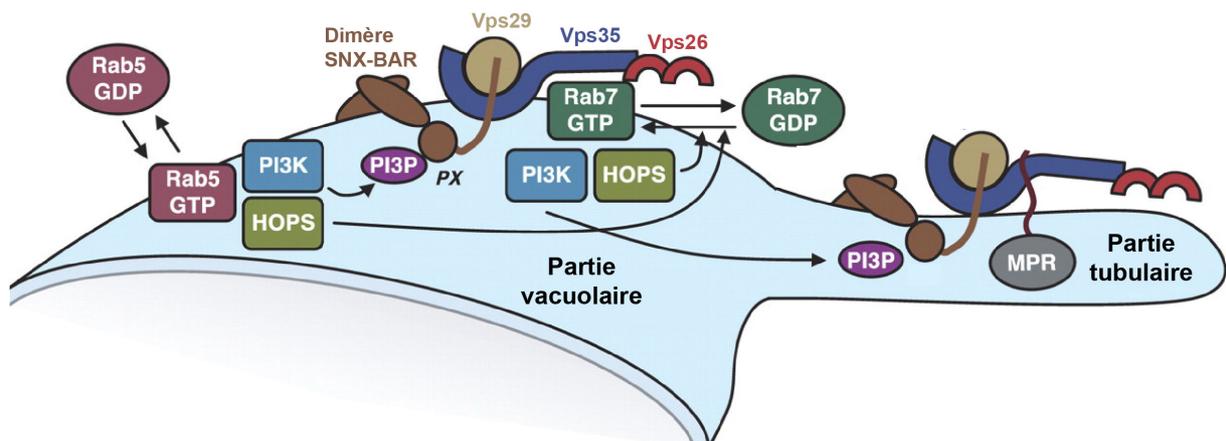


Figure 40 : Cinétique de recrutement du rétromère.

Le schéma représente la maturation d'un endosome de Rab5 vers Rab7 et la cinétique de recrutement du rétromère. Du fait de ses interactions avec le PI(3)P (endosomes précoces) et Rab7 (endosomes tardifs), le recrutement du rétromère est supposé avoir lieu durant une étape de transition très spécifique du compartiment. Les différents composants des parties vacuolaire et tubulaire des endosomes peuvent jouer un rôle dans ce recrutement. Adapté de (Rojas et al., 2008; Seaman, 2012).

Les SNX composant le rétromère recrutent ensuite des moteurs moléculaires. Les dynéines recrutées interagissent avec le réseau de microtubules et génèrent une force permettant l'élongation du tubule en cours de formation. Il a également été démontré que le rétromère peut recruter un autre complexe, appelé WASH. Ce complexe, qui fait partie de la famille WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein), est

un régulateur d'actine. Son rôle n'est pas encore clairement identifié, mais il semblerait qu'il permette de stabiliser des microdomaines membranaires via une polymérisation d'actine (Harbour et al., 2010; Harbour et al., 2012). Nous pouvons également supposer que la polymérisation d'actine génère une force mécanique permettant de tirer sur le tube et de favoriser son élongation. Cette dernière est aussi favorisée par l'interaction avec des moteurs moléculaires liés aux microtubules, qui vont également tirer sur le tube. Enfin, une fois le tubule formé grâce aux actions de WASH et des moteurs moléculaires, des événements de fission pourront avoir lieu et permettre la naissance d'une vésicule, qui sera finalement adressée au TGN. Les protéines intervenant dans le phénomène de scission du tubule ne sont pas encore clairement identifiées. Cependant, il semblerait que le rétromère puisse recruter la protéine EHD1, laquelle peut s'assembler en oligomères et favoriser la rupture membranaire (Figure 41) (Derivery et al., 2009; Gomez and Billadeau, 2009; Jia et al., 2010; Lenz et al., 2009; Naslavsky and Caplan, 2011).

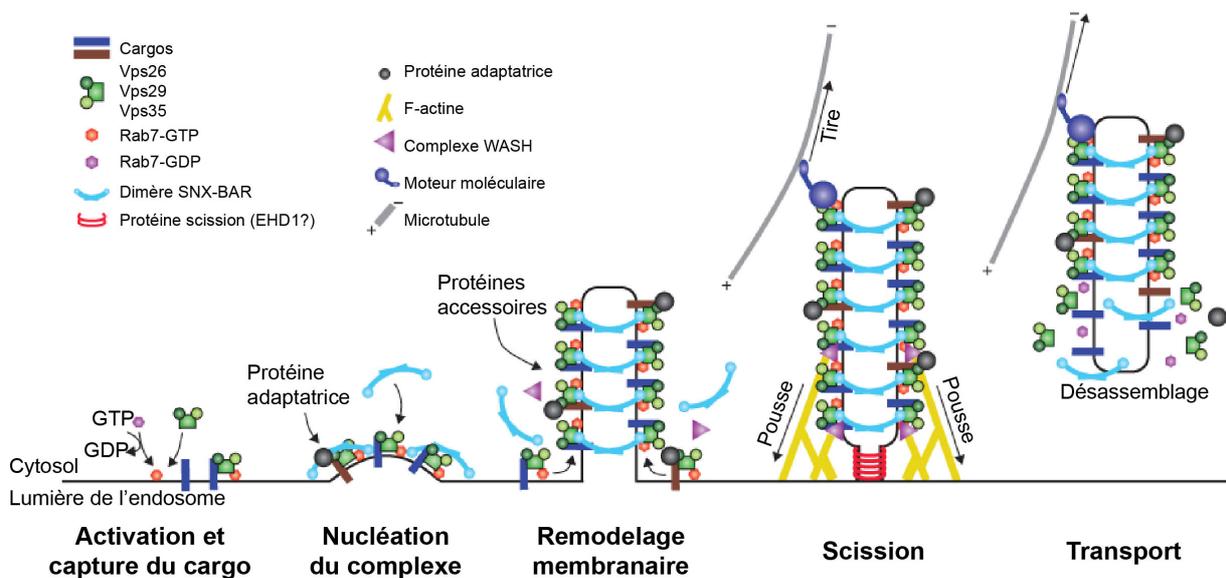


Figure 41 : Modèle proposé de tubulation/scission par le rétromère.

L'activation et la sélection du cargo sont effectuées par le cœur du complexe composé des sous-unités Vps 26, 29 et 35, au niveau des endosomes en cours de maturation. L'incorporation d'autres cargos dans le complexe nucléé se fait par des adaptateurs spécifiques ; puis le dimère SNX-BAR rentre en jeu par interaction directe et/ou mouvement latéral le long de l'endosome. Ceci a pour conséquence l'augmentation de la concentration en rétromère, remodelant ainsi la membrane et initiant la formation de tubules. Cette région fortement concentrée permet d'une part de séquestrer de nombreuses protéines accessoires, d'autre part de finaliser le remodelage membranaire. La polymérisation d'actine et l'action de moteurs moléculaires génèrent des forces opposées facilitant la fission de la vésicule de transport, en augmentant la tension membranaire avec ou sans l'appui d'enzymes comme la dynamine ou EHD1. Directement après la fission, les protéines

présentes à la surface de la vésicule de transporteur se désassemblent, probablement par une consommation d'ATP ou inactivation de Rab7. Adapté de (Cullen and Korswagen, 2012).

Nous avons donc vu que la maturation des endosomes précoces est un mécanisme faisant intervenir différents complexes protéiques, lesquels permettent une bonne ségrégation des cargos au niveau de microdomaines. Ces cargos seront ensuite pris en charge spécifiquement et adressés à leur compartiment cible. D'un côté, le domaine vacuolaire de l'endosome va poursuivre sa maturation jusqu'à fusionner avec des lysosomes et dégrader le matériel qu'il contient. De l'autre, les parties tubulaires de l'endosome sont formées grâce à des protéines déformant les membranes. La fission en vésicule permet ensuite au contenu de rejoindre un autre compartiment. Le transport rétrograde fait partie de ce système, mais un autre mécanisme majeur, complexe et largement étudié, intervient également, permettant le recyclage des cargos sélectionnés à la surface de la membrane plasmique.

3) Les voies de recyclage

Les voies de recyclage sont associées aux mécanismes d'endocytose et permettent de contrôler la composition de la membrane plasmique. Une grande partie des connaissances actuelles ont été collectées grâce au récepteur à la transferrine, qui est le cargo modèle pour étudier le recyclage. Cependant ces dernières années, différents facteurs modulant le recyclage ont été identifiés. Ces facteurs mettent en évidence la présence de structures tubulaires permettant la ségrégation des cargos puis leur recyclage vers la membrane plasmique. Ces mécanismes jouent un rôle très important dans des processus comme le recyclage de récepteurs aux nutriments, la cytocinèse, la migration, l'adhérence cellulaire, la phagocytose... Ces machineries de recyclage peuvent également être détournées au profit de certains pathogènes intracellulaires lors de leur infection (Figure 42). Il a également été démontré, dans le cas des cellules neuronales, que le recyclage est impliqué dans l'apprentissage et la mémorisation. Le recyclage est un phénomène hautement dynamique : il a été estimé qu'une cellule internalise l'équivalent de 1 à 5 fois sa surface par heure, ce qui montre l'importance d'un système de retour à la membrane plasmique efficace et finement régulé (Steinman et al., 1983). Quelle que soit la voie d'endocytose empruntée (clathrine dépendante ou indépendante), toutes les

vésicules d'endocytose primaires fusionnent et forment les endosomes précoces (ou de tri).

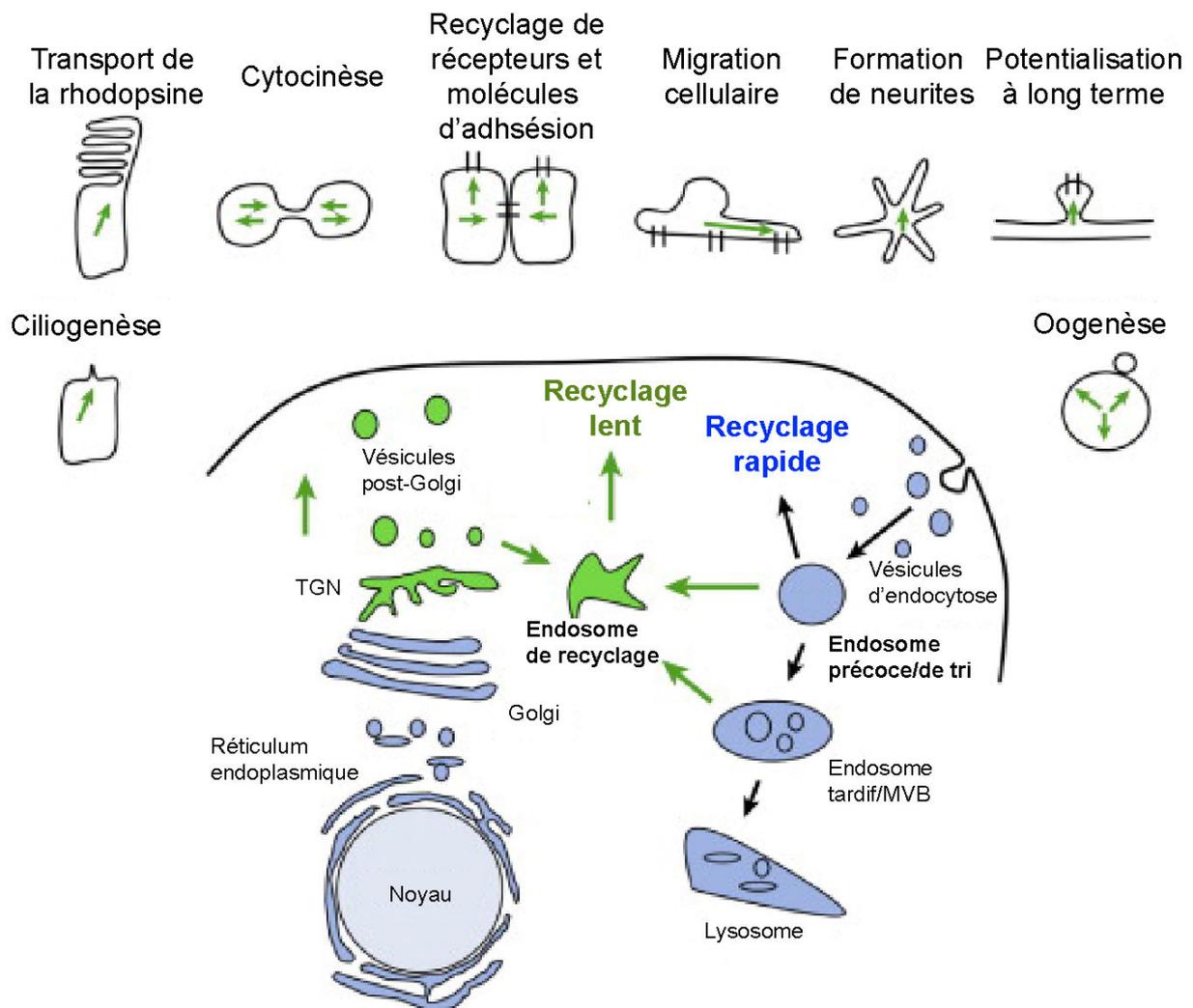


Figure 42 : Fonctions des voies de recyclage.

Les voies de recyclage lente et rapide interviennent dans plusieurs fonctions cellulaires. Les endosomes de recyclage sont importants pour l'adhérence et la migration cellulaire, la cytocinèse, le recyclage de récepteurs, le transport de la rhodopsine, la formation de neurites, la potentialisation à long terme ou encore l'oogenèse. Adapté de (Welz et al., 2014)

Il existe deux voies principales conduisant les cargos des endosomes de tri vers la membrane plasmique. Certaines molécules sont adressées directement de l'endosome de tri vers la membrane plasmique, tandis que d'autres transitent par un compartiment de recyclage ou ERC (endocytic recycling compartment). Tous ces mécanismes de recyclage sont hautement conservés, comme par exemple dans les cellules HeLa, Cos, MCF7, lymphocytes B, cellules dendritiques ou encore l'intestin

de *Caenorhabditis elegans* (Chen et al., 2006; Gong et al., 2007; Shi et al., 2007; Walseng et al., 2008; Zimmermann et al., 2005). Les principaux régulateurs de ce système sont les petites GTPases Rabs et Arfs, ainsi que leurs effecteurs, comme les protéines RAB11-FIPs ou EHDs sur lesquelles nous reviendrons plus tard.

a) La voie de recyclage rapide

Cette voie correspond au retour de cargos à la membrane plasmique, comme le récepteur à la transferrine ou encore de glycosphingolipides directement depuis les endosomes précoces (ou même de vésicules primaires d'endocytose). Les premières études ont identifié la petite GTPase Rab4 comme essentielle pour le recyclage de ces cargos depuis les endosomes de tri. La fonction de Rab4 dans le recyclage rapide n'est pas clairement définie. La surexpression de Rab4 favorise le recyclage du TfR et augmente son niveau d'expression à la membrane plasmique (McCaffrey et al., 2001; van der Sluijs et al., 1992). A l'inverse, la surexpression d'un dominant négatif de Rab4 ou d'un GAP de Rab4 (TBC1D16) inhibe le recyclage du TfR (Cormont et al., 2003; Goueli et al., 2012). De façon inattendue, l'extinction via l'utilisation d'ARN interférence de Rab4 augmente le recyclage du TfR (Deneka et al., 2003). La surexpression d'effecteurs de Rab4, comme Rabip4 ou D-AKAP2, induit un mélange d'endosomes précoces et de recyclage, et inhibe le recyclage du TfR (Eggers et al., 2009). Il est difficile de conclure sur le rôle exact de Rab4 dans le recyclage rapide, et ceci peut partiellement être expliqué par le fait que les études n'ont pas été faites sur les mêmes types cellulaires, et qu'il existe 2 protéines très proches Rab4a et Rab4b, pour lesquelles la spécificité des effecteurs étudiés n'a pas été testée. Même si de nombreuses études ont utilisé Rab4a, il a été montré que Rab4b est aussi impliquée dans le recyclage du TfR (Perrin et al., 2013).

Par la suite, des études d'ARN interférence ont prouvé que Rab35, qui se trouve localisée au niveau de la membrane plasmique et des endosomes précoces, est également impliquée dans le recyclage rapide du récepteur à la transferrine (Kouranti et al., 2006). La surexpression de TBC1D10C, un GAP de Rab35, ou l'extinction de Rab35, perturbe également le recyclage du TfR, mais aussi la formation des synapses immunologiques, en dérégulant le recyclage du TCR, (T cell receptor) composant précoce et majeur de ces structures (Patino-Lopez et al., 2008). Ceci met en évidence une fonction ciblée du recyclage rapide dans des cellules spécialisées.

En plus de ces fonctions dans le recyclage rapide, Rab35 a été largement impliquée dans la cytokinèse et, spécifiquement, dans le phénomène d'abscission qui consiste en la rupture finale du pont intracellulaire reliant cellules mère et fille (Chesneau et al., 2012; Dambournet et al., 2011).

b) La voie de recyclage lent

Cette voie a été nommée ainsi par opposition à la voie de recyclage rapide. Elle est caractérisée par le passage du cargo d'abord dans les endosomes de tri, puis dans les compartiments de recyclage, enfin à la membrane plasmique. Dans la plupart des cellules, le compartiment de recyclage est proche du centre organisateur des microtubules, au centre de la cellule, proche du Golgi. Les exceptions les plus courantes sont les cellules polarisées. L'ERC proviendrait des extensions des microdomaines tubulaires des endosomes précoces, via l'échange de Rab5 par Rab4 ou Rab11 (Sonnichsen et al., 2000).

i) *Des endosomes de tri vers l'ERC*

Plusieurs facteurs ont été identifiés comme étant importants dans le positionnement de l'ERC, ainsi que dans le transport des cargos internalisés vers ce compartiment. Des protéines de la famille des EHDs sont impliquées dans ce transport. EHD4 intervient dans l'export de l'endosome précoce vers l'ERC (mais également vers les endosomes tardifs) (Sharma et al., 2008). EHD3 interagit avec deux effecteurs de Rab5 et Rab11, qui sont respectivement Rabénosyne 5 et Rab11-FIP2. Cela suggère qu'EHD3 établit une connexion entre les endosomes de tri et de recyclage (Naslavsky et al., 2006). Rab11-FIP5, un autre effecteur de Rab11, est important pour le mouvement du TfR des endosomes de tri vers l'ERC. L'extinction de Rab11-FIP5 inhibe le transport du TfR entre endosomes précoces et de recyclage, et augmente le recyclage de ce dernier, probablement par l'intermédiaire d'une compensation de la voie rapide de recyclage. Rab22a est aussi impliquée dans le transport du TfR des endosomes précoces vers l'ERC, l'inhibition de son expression par ARN interférence entraînant l'inhibition du recyclage lent du TfR (Magadan et al., 2006). Rab11-FIP3, un partenaire de Rab11 et Arf6, est impliqué dans le positionnement du compartiment de recyclage à proximité du noyau (Horgan et al., 2007). Enfin, une autre petite GTPase, Rab10, a également un rôle dans le transport

des endosomes précoces vers l'ERC, mais spécifiquement dans les cellules épithéliales polarisées (Babbey et al., 2006).

La SNX4 est aussi une protéine clef dans le mouvement des endosomes précoces vers les compartiments de recyclage. La sorting nexin 4 est retrouvée associée aux deux types de compartiments, mais son extinction conduit à l'adressage du TfR vers les endosomes tardifs en vue de sa dégradation. Cet adressage se fait grâce à l'interaction de la SNX4 et d'une dynéine (par l'intermédiaire de la protéine KIBRA), permettant le mouvement de l'endosome précoce vers la région périnucléaire. L'extinction de la protéine KIBRA engendre une distribution périphérique du TfR, mais pas sa dégradation, ce qui suggère que la SNX4 coordonne la sortie du récepteur avec la dynéine, l'empêchant ainsi d'atteindre les endosomes tardifs (tout comme les SNX1, 2, 5 et 6 sont impliquées dans le transport rétrograde) (Traer et al., 2007). Enfin, une dernière étude concernant le transport des endosomes précoces vers les endosomes de recyclage a mis en évidence une communication indirecte entre endocytose dépendante et indépendante de la clathrine. Même si la voie d'internalisation n'est pas ce qui détermine directement et spécifiquement l'adressage des protéines internalisées, il a été prouvé que l'absence du complexe AP-2 augmente la quantité de CMH-I et de la β -intégrine adressée aux lysosomes sans modifier leur internalisation). L'adressage de ces deux cargos, internalisés de façon indépendante de la clathrine, est sensible à l'extinction d'un complexe essentiel de la voie dépendante de la clathrine. Ceci suggère que la voie dépendante de la clathrine apporterait avec elles des composants nécessaires pour le recyclage de certains cargos de la voie clathrine indépendante (Lau and Chou, 2008).

ii) De l'ERC vers la membrane plasmique

Plusieurs voies de recyclage partant de l'ERC et allant jusqu'à la membrane plasmique sont connues. Dans les cellules HeLa, le TfR emprunte une voie distincte d'autres cargos. Les protéines centrales du recyclage de l'ERC vers la membrane plasmique sont Rab11 et ses partenaires (principalement les Rab11-FIPs). Leur perturbation entraîne une altération du recyclage ou une délocalisation de l'ERC. Le recyclage du TfR est dépendant de Rab11, de même que celui du CMH-I ou de la β -intégrine (Naslavsky et al., 2003; Powelka et al., 2004; Weigert et al., 2004). Au niveau de l'ERC, Rab11 peut, par exemple, recruter la kinésine KIF13A, qui grâce à

son association avec les microtubules, permet de tirer la membrane de l'ERC et de former ainsi des tubules. Des études récentes ont montré que ces tubules peuvent ensuite donner naissance à des vésicules, par l'action de la spastine et du complexe ESCRT. La régulation du réseau Rab11 utilise donc différents mécanismes pour l'extension des tubules et leur fractionnement en vésicules (Baetz and Goldenring, 2013; Delevoeye et al., 2014). Ce sont à l'heure actuelle les seuls mécanismes mis en évidence pour le transport de cargos des endosomes de recyclage vers la membrane plasmique. Une autre étude récente suggère que la phosphatidylsérine, est aussi impliquée dans le recrutement de Rab11 et de ses partenaires Rab11-FIPs.

En dehors de Rab11, d'autres protéines interviennent pour assurer un recyclage efficace. Dans le cas du recyclage du CMH-I et de la β 1-intégrine, Arf6 active la phospholipase D2 (PLD2), ce qui permet la production d'acide phosphatidique (PA) et de diacylglycérol (DAG) (Jovanovic et al., 2006). L'acide phosphatidique est impliqué dans la fission membranaire et peut aussi faciliter la libération des vésicules de transport ; le DAG, pour sa part, intervient dans la fusion membranaire, ce qui pourrait faciliter la fusion des vésicules de transport avec la membrane plasmique. Arf6 active également la PI(4)P5 kinase, permettant la production de PI(4,5)P₂ présent au niveau de la membrane plasmique et au niveau des extrémités des tubules membranaires (Brown et al., 2001). Le PI(4,5)P₂ permet ensuite le recrutement de nombreux facteurs requis pour la formation et la fusion de vésicules, ainsi que la polymérisation d'actine. Par exemple, Arf6 peut interagir avec JIP3 et JIP4 (Jun N-terminal kinase), des protéines d'échafaudage recrutant des moteurs moléculaires. Grâce à ses interactions, Arf6 peut contrôler la direction du transport le long des microtubules (Montagnac et al., 2009). Les interactions Arf6/JIP sont très importantes notamment pendant la cytokinèse. Ces mêmes compartiments de recyclage dépendant d'Arf6 modulent l'actine corticale lors de l'étalement et de la migration cellulaire au cours d'expérience de cicatrisation, ou dans le cas des métastases (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).

D'autres protéines Rabs sont liées au recyclage depuis l'ERC vers la membrane plasmique. Au rang de celles-ci figure Rab22a, dont l'implication dans le transport des endosomes de tri vers l'ERC a été discutée. Rab22a est aussi cruciale dans le retour à la membrane plasmique du CMH-I et du CD1a (Barral et al., 2008). Rab8 est également présente au niveau des tubules des endosomes ; elle peut en effet recruter des effecteurs pour promouvoir le recyclage et la formation de protrusions

membranaires, ces dernières dépendant de l'actine et de l'action des protéines MICAL-L1 et EHD1 (Cai et al., 2013; Hattula et al., 2006; Kobayashi et al., 2014b; Lin et al., 2001; Rahajeng et al., 2012; Reinecke et al., 2014; Roland et al., 2007; Xie et al., 2014). Nous discuterons de ce mécanisme *infra*. Enfin, il a été démontré l'implication de Rab13 et Rab10, qui présentent toutes deux une très forte homologie avec Rab8, dans des événements de recyclage. Lorsque tel est le cas, ces protéines interviennent dans des fonctions cellulaires spécialisées : Rab13 dans le recyclage des protéines de jonction des cellules épithéliales, et Rab10 dans le recyclage au niveau des cellules intestinales de *Caenorhabditis elegans* (Chen et al., 2006; Morimoto et al., 2005; Nokes et al., 2008).

Il existe donc plusieurs voies de recyclage provenant de l'ERC, en direction de la membrane plasmique. L'ERC semble donc organisé en différents domaines, recrutant des machineries spécifiques parfois partagées pour un même cargo (Kobayashi and Fukuda, 2013a) (Figure 43).

Le bilan de ces études permet, semble-t-il, de distinguer, au niveau des endosomes de recyclage, deux groupes de protéines, alternativement associées à des domaines enrichis en Rab11 ou en Rab8. Ces domaines gouverneraient donc la mise en place de structures tubulaires, responsables du transport des cargos vers la membrane plasmique.

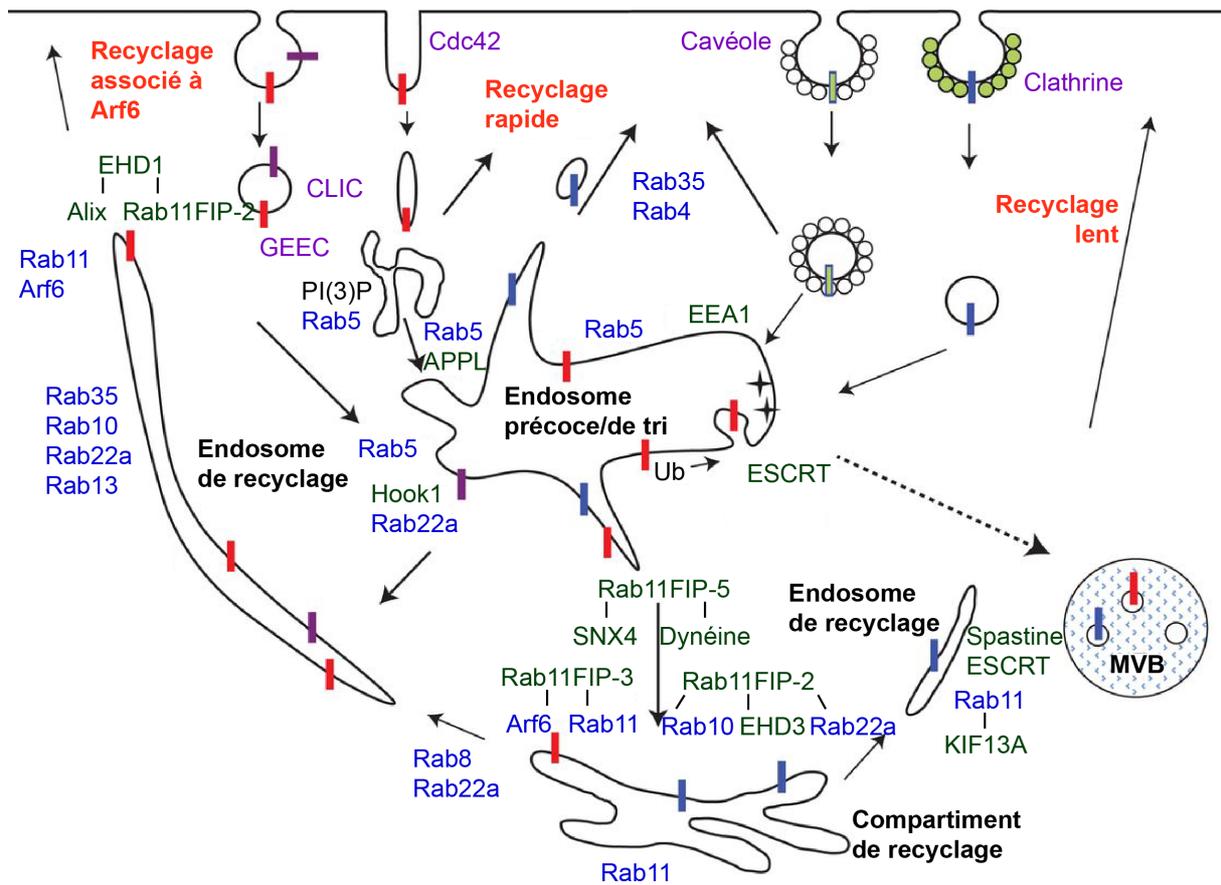


Figure 43 : Vue globale des voies classiques de recyclage.

Ce schéma représente les différentes voies d'endocytose (violet pâle) et de recyclage (rouge), ainsi que les différentes petites GTPases (bleu) et leurs effecteurs (vert). Adapté de (Mayor et al., 2014).

iii) Recyclage dépendant du rétromère

Ces dernières années, le rétromère - initialement identifié pour son rôle dans le transport rétrograde - a été identifié comme étant impliqué dans plusieurs mécanismes de recyclage directs ou indirects. Il intervient dans le retour du récepteur β 2-adrénergique (β 2AR) et du transporteur de fer DMT1-II (divalent metal transporter 1) à la membrane plasmique. Dans le cycle de capture du fer par la cellule, DMT1-II et le TfR sont fonctionnellement couplés. DMT1-II permet l'entrée de fer de façon dépendante du pH au niveau de la membrane de l'endosome de tri. Comme nous l'avons déjà vu, le TfR va majoritairement être adressé aux endosomes de recyclage, puis va rejoindre directement la membrane plasmique. DMT1-II va suivre un parcours différent : elle est d'abord reconnue par le rétromère (par l'intermédiaire du trimère Vps26/29/35), puis successivement transportée vers le TGN, les endosomes de recyclage et la membrane plasmique. A ce stade, TfR et

DMT1-II peuvent être engagés dans un nouveau cycle de capture de transferrine (Figure 44) (Canuel et al., 2008; Tabuchi et al., 2010).

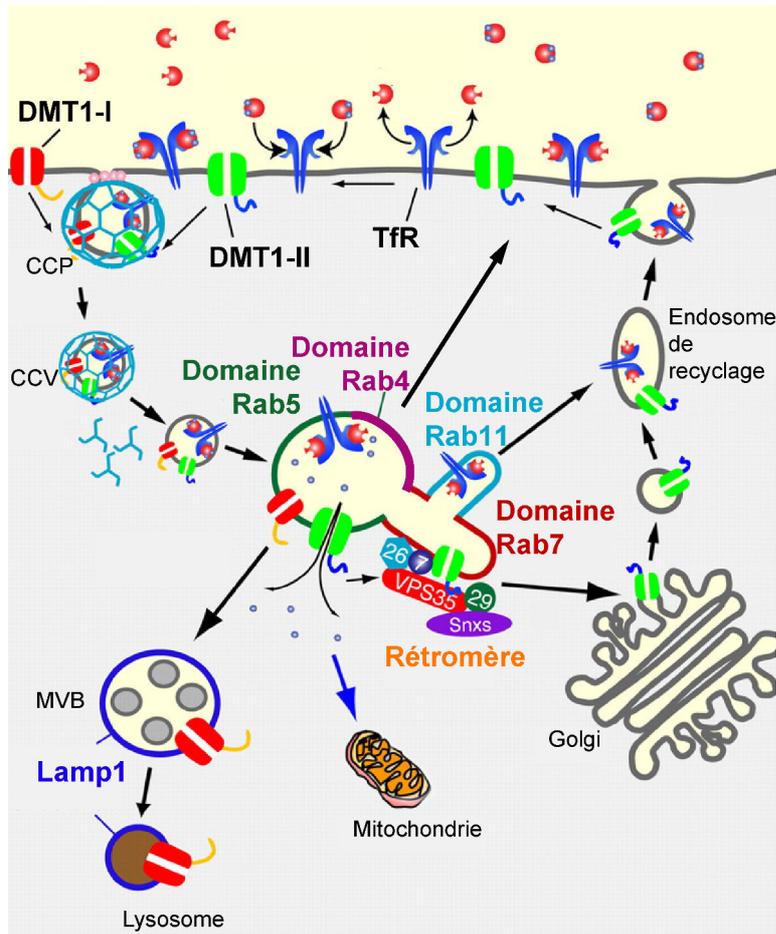


Figure 44 : Recyclage du DMT1-II à la membrane plasmique via le TGN.

DMT1-II et le TfR sont fonctionnellement associés pour réaliser une assimilation de fer pH-dépendante au travers de la membrane des endosomes ; les 2 molécules sont recyclées entre la membrane plasmique et les endosomes. Le TfR est directement transporté vers la membrane plasmique (domaine Rab4), ou transite par les endosomes de recyclage (domaine Rab11), alors que DMT1-II est reconnue par le rétromère et transite par le Golgi, avant d'être redirigé vers les endosomes de recyclage. Une fois recyclées, les 2 molécules sont disponibles pour effectuer un nouveau cycle. Adapté de (Tabuchi et al., 2010).

Le recyclage du récepteur β 2AR fait intervenir le rétromère, mais aussi la SNX27 et le complexe WASH. LA SNX27 contient un domaine PDZ (post synaptic density protein (PSD95)/Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)/Zonula occludens-1 protein (zo-1)) capable de reconnaître le domaine C-terminal du β 2AR. La SNX27 joue donc le rôle d'adaptateur et permet de lier le récepteur au rétromère. Initialement, la SNX27 avait été décrite comme interagissant avec le rétromère par l'intermédiaire de WASH (Temkin et al., 2011), mais des études récentes de

protéomique ont montré depuis que SNX27 pourrait faire partie du rétromère lui-même (McGough et al., 2014; Steinberg et al., 2013). Le recyclage du β 2AR ne se fait pas par le TGN, comme dans le cas de DMT1-II, mais directement à la membrane plasmique par un mécanisme faisant intervenir Rab4 (Lauffer et al., 2010). Ces mêmes études montrent que le β 2AR n'est pas le seul ligand qui pourrait emprunter cette voie de recyclage (le transporteur de glucose GLUT1, le transporteur MCT1, le récepteur GPCR-like CD97, la métallo-réductase STEAP3, la protéine KIDINS220, le transporteur de cuivre ATP7A, le transporteur de zinc ZnT1 et bien d'autres). Ces études à grande échelle confirment aussi que le rétromère est impliqué dans le recyclage de différents cargos, certains étant dépendants de SNX27, d'autres non.

Il faut désormais confirmer l'implication du rétromère et du complexe WASH et déterminer si le recyclage de ces cargos se fait directement (via Rab4) ou passe par le TGN avant d'atteindre la membrane plasmique.

c) Recyclage et fonctions cellulaires

i) *Recyclage et cytokinèse*

Au début de la division cellulaire, le recyclage est momentanément arrêté, mais pas l'endocytose. Ceci conduit à une accumulation de fractions de la membrane plasmique dans des endosomes. Il en résulte une réduction de la surface de la cellule, ce qui explique que la cellule devienne ronde (Boucrot and Kirchhausen, 2007). Le recyclage intervient ensuite, au moment de l'abscission. A ce moment, les endosomes de recyclage présentent une organisation caractéristique influencée par la réorganisation du réseau de microtubules dans la cellule (Figure 45). Ce mécanisme implique les compartiments Rab11, Rab35 et Arf6. Ils véhiculent des protéines nécessaires pour le remodelage cellulaire, comme l'organisation lipidique (qui est complètement modifiée au cours de la division cellulaire) via la phosphatase OCRL (ou INNPP5F), une PI(4,5)P₂ 5-phosphatase. Il a été démontré que cette phosphatase permet d'hydrolyser le PI(4,5)P₂ enrichi (et nécessaire) au niveau du pont intracellulaire, afin d'arrêter le recrutement de facteurs par le PI(4,5)P₂. OCRL est recrutée par Rab35 et permet également un remodelage du cytosquelette

d'actine, qui est crucial pour une bonne abscission (Boucrot and Kirchhausen, 2007; Chesneau et al., 2012; Dambournet et al., 2011; Echard and Haucke, 2015; Kouranti et al., 2006).

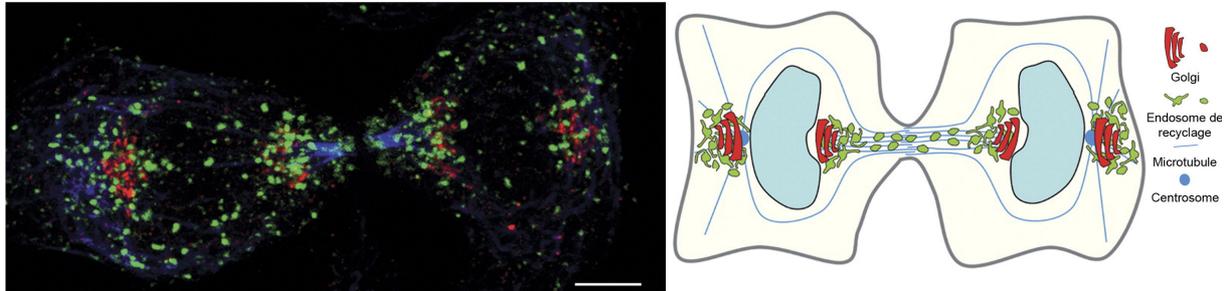


Figure 45 : Réorganisation des endosomes de recyclage au cours des étapes finales de la cytokinèse.

Image de microscopie à fluorescence représentant des cellules HeLa en fin de cytokinèse. On retrouve d'une part 4 groupes de vésicules correspondant au Golgi, marquées avec un anticorps anti-giantine (rouge), d'autre part les endosomes contenant la Tf (vert) organisés autour du Golgi de part et d'autre du pont intracellulaire reliant les 2 cellules. Les microtubules sont marqués avec un anticorps anti-tubuline α (bleu). Barre d'échelle 5 μ m. Adapté de (Montagnac et al., 2008).

ii) Recyclage et adhérence cellulaire

Le recyclage intervient dans différents processus modulant l'adhérence cellulaire. Les deux principaux processus sont le recyclage de la E-cadhérine, molécule d'adhésion impliquée dans la formation des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales, et le recyclage des intégrines, responsables de l'adhérence de la cellule avec la matrice extracellulaire permettant la migration.

Une fois internalisée, l'envoi de la E-cadhérine vers la dégradation ou le recyclage est un choix crucial pour l'adhérence cellulaire, ainsi que la morphogénèse. Dans ce mécanisme, les protéines Rab11, Arf6 et SNX1 régulent le recyclage de la E-cadhérine vers la membrane plasmique. La SNX1 stimule l'envoi de la E-cadhérine vers le transport rétrograde jusqu'au Golgi, avant d'être prise en charge par des compartiments de recyclage contenant Rab11 et Arf6. La E-cadhérine est convoyée alors vers la membrane plasmique (Bryant et al., 2007; Chung et al., 2014; Lock and Stow, 2005; Palacios et al., 2001). Les dernières études dans ce domaine montrent que la SNX4 et Rab4 seraient elles aussi impliquées dans le recyclage des molécules de jonction intercellulaire, mais cela doit être mieux caractérisé (de Madrid et al., 2015; Solis et al., 2013). L'assemblage et le recyclage des jonctions serrées

fait intervenir la protéine Rab13, et un de ses effecteurs, la PKA (proteïn kinase A). En effet, Rab13 peut interagir directement avec la PKA, ce qui a pour effet d'inhiber sa capacité à phosphoryler VASP, une protéine impliquée dans le remodelage de l'actine. VASP, mais aussi les protéines constituant les jonctions serrées (claudine-1 et ZO-1 (zonula occludens protein 1)) ne sont alors pas recrutées, et l'assemblage de la jonction n'a pas lieu (Kohler et al., 2004; Kohler and Zahraoui, 2005; Marzesco and Zahraoui, 2005; Zahraoui, 2005).

Concernant les intégrines, la voie canonique comprend deux chemins distincts, spatialement et temporellement, appelés cycle court et cycle long. Le recyclage par cycle court est dépendant de Rab4 ; il permet un retour rapide des intégrines à la membrane plasmique. En revanche, les récepteurs empruntant le cycle long, impliquant Rab11, sont relocalisés au niveau de l'ERC avant de retourner à la membrane plasmique. Ces deux cycles facilitent le renouvellement des molécules d'adhésion et procurent à la cellule une fraction d'intégrines prêtes à être engagées dans une interaction avec la matrice extracellulaire, pour générer de nouvelles adhésions (Figure 46) (Caswell and Norman, 2006; De Franceschi et al., 2015; Morgan et al., 2009; Scita and Di Fiore, 2010). De récentes études ont également révélé le rôle de la SNX17, Rab35 et Arf6 dans le recyclage des intégrines (Allaire et al., 2013; Osborne et al., 2015; Steinberg et al., 2012). De plus, les intégrines ne sont pas les seules molécules qui sont recyclées pendant la migration cellulaire. C'est aussi le cas des récepteurs tyrosine kinase, qui jouent un rôle dans la guidance de la cellule et sont régulés de concert avec les molécules d'adhésion et la signalisation cellulaire (Hirata et al., 2014; Maritzen et al., 2015; Parachoniak et al., 2011).

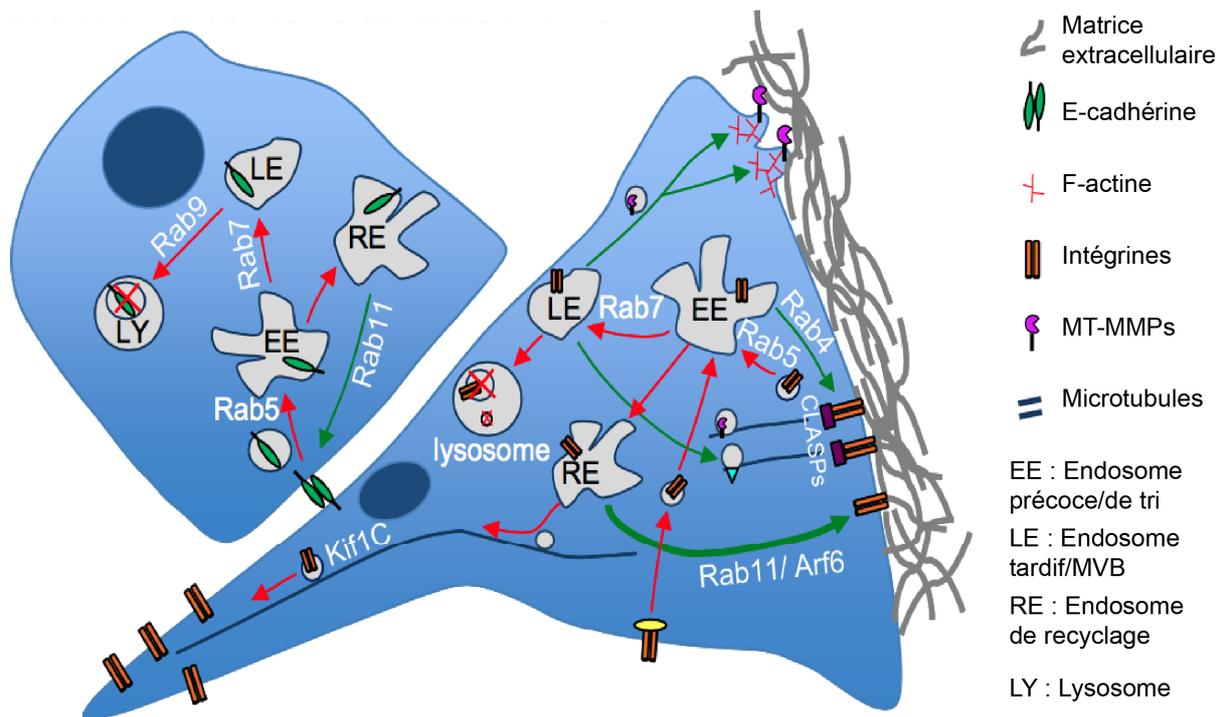


Figure 46 : Voies de recyclages impliquées dans les contacts intercellulaires et l'adhérence à la matrice extracellulaire.

Les sites de contacts intercellulaires ou entre cellules et matrice extracellulaire sont régulés par l'internalisation des molécules d'adhésion, telles que les intégrines et la E-cadhérine, qui peuvent être adressées à la voie de dégradation ou recyclées à la membrane plasmique. De plus, le trafic vésiculaire procure des facteurs facilitant le désassemblage des points focaux d'adhésion mais aussi la modulation de la matrice extracellulaire. Adapté de (Maritzen et al., 2015).

iii) Recyclage et fusion cellulaire

La fusion des myoblastes est un phénomène nécessitant l'intervention d'évènements de recyclage. Cette fusion est indispensable lors du développement mais aussi au cours de la croissance et de la régénération des muscles squelettiques. Un des facteurs important pour que la fusion soit effective est Rac1. Rac1 est enrichie au niveau des contacts cellule-cellule, avant la fusion cellulaire ; elle est certainement responsable du remodelage local du cytosquelette d'actine, permettant d'induire la fusion cellulaire. La protéine Arf6 et un de ses GEF (ArfGEP100) interviennent aussi en stimulant l'apport des cargos des endosomes de recyclage vers le site de fusion. La perturbation d'Arf6, ou de son GEF, altère la localisation et l'activation de Rac1, partant la fusion cellulaire. En effet Rac1 est activée au niveau de la membrane des endosomes, puis transportée dans une vésicule sous l'action d'Arf6. Enfin, d'autres protéines comme EHD2 ou la myoferline ont aussi un impact sur la fusion cellulaire.

Cependant, leur effet sur l'accumulation de Rac1 au niveau des contacts n'est toujours pas démontré (Benjamin et al., 2011; Chen et al., 2003; Doherty et al., 2008; Palamidessi et al., 2008). Malgré ces études, l'implication des machineries de recyclage est évidente dans ces évènements, mais reste très peu documentée. De plus, la plupart des études ont été menées chez *Drosophila melanogaster* et doivent être confirmées dans des cellules de mammifère.

iv) Recyclage et potentialisation à long terme

Le remodelage des connexions synaptiques est une étape clé dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Ces processus peuvent être mis en évidence grâce à l'étude du remodelage des épines dendritiques dans l'hippocampe de mammifère. L'activation de NMDAR (N-methyl-D aspartate receptor) durant la potentialisation à long terme provoque une augmentation des épines, mais également du nombre d'AMPARe (α -amino-3-hydroxy-5methyl-4isoxazole propionic acid receptors) résidents. Ces deux modifications caractéristiques sont dépendantes de la fonction des endosomes de recyclage positifs pour Rab11 et EHD1. La myosine Vb joue un rôle majeur dans ce mécanisme. Dans des conditions de faible concentration en calcium, la myosine Vb est dans une conformation fermée, ne pouvant s'associer aux endosomes de recyclage. En revanche, en présence d'une concentration en calcium plus élevée, la myosine Vb est activée et associée aux endosomes de recyclage grâce à son interaction avec Rab11-FIP2, ce qui conduit à une augmentation du recyclage et, dès lors, une augmentation d'AMPARe à la membrane plasmique. L'association des AMPARe dans la membrane plasmique semble être régulée par la protéine Rab8, au niveau des épines dendritiques (Figure 47) (Brown et al., 2007; Chung et al., 2009; Derkach et al., 2007; Gerges et al., 2004; Park et al., 2004; Wang et al., 2008).

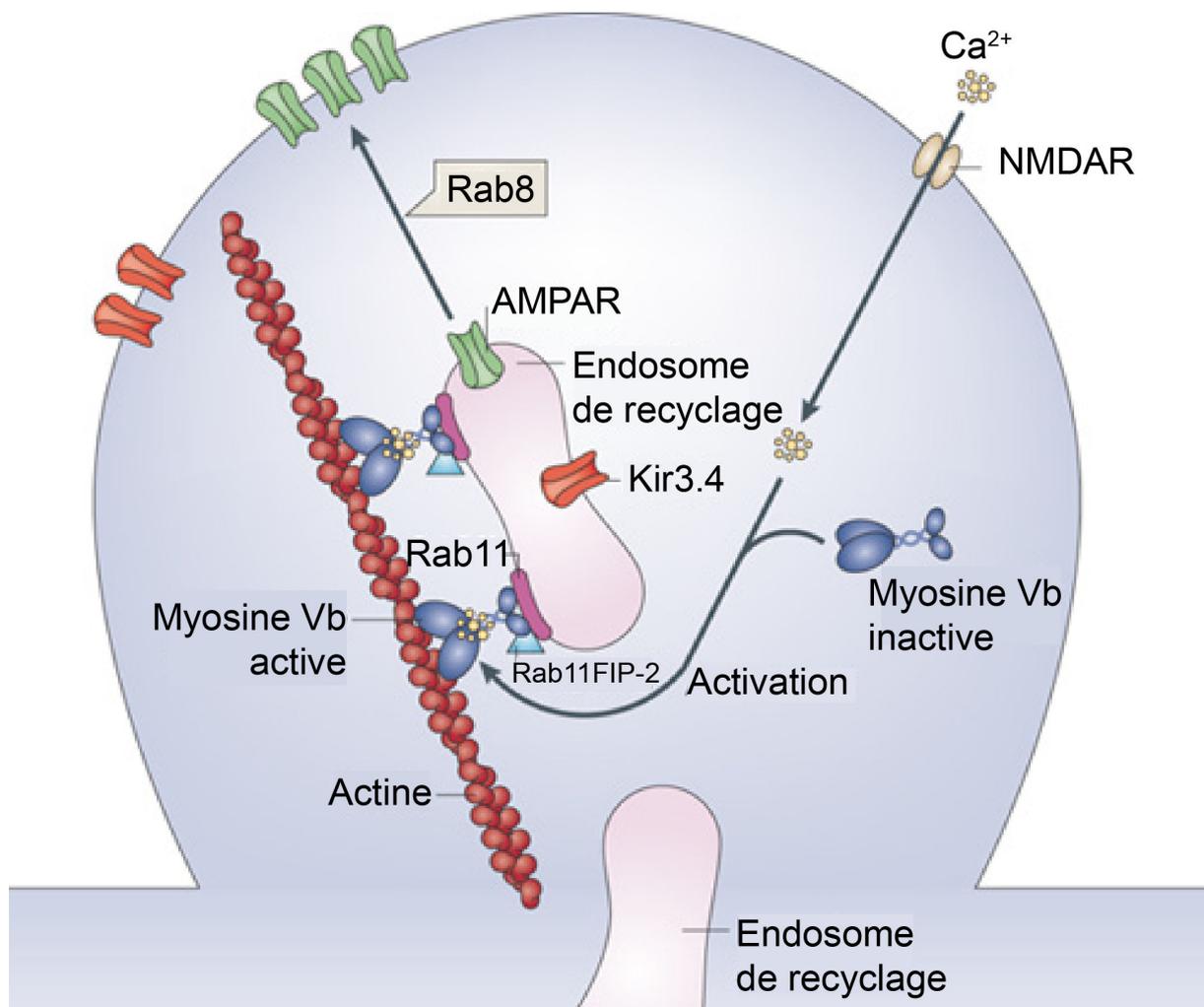


Figure 47 : Vue d'ensemble du rôle de la machinerie de recyclage dans la potentialisation à long terme.

Au niveau des membranes post-synaptiques, la potentialisation à long terme dépendante des NMDARs nécessite la myosine Vb, qui est un partenaire de Rab11-FIP2. L'activation des NMDARs provoque un influx de calcium, provoquant l'activation de la myosine Vb et la translocation des endosomes de recyclage et de leurs cargos, au niveau des épines. La surface de ces régions s'en trouve augmentée et accroît la densité des AMPARs. La densité du canal potassium Kir3.4 est également augmentée au niveau des épines dendritiques. Le transport final de l'endosome de recyclage vers la surface de l'épine est dépendant de l'action de Rab8. Adapté de (Grant and Donaldson, 2009).

v) Recyclage et polarisation cellulaire

Dans les cellules polarisées, les compartiments intracellulaires présentent une nomenclature différente (Figure 48). On distingue, notamment au niveau des compartiments de recyclage, les compartiments de recyclage communs et les compartiments de recyclage apicaux. Les compartiments de recyclage communs peuvent faire transiter des cargos destinés aussi bien à la membrane basolatérale

qu'à la membrane apicale, alors que les compartiments de recyclage apicaux sont restreints aux cargos destinés à la membrane apicale de la cellule épithéliale. Par exemple, certains cargos provenant du TGN n'accèdent à la membrane plasmique que par un passage obligatoire par ces compartiments de recyclage. Ce transport repose principalement sur les petites GTPases Rab8, Rab10 et Rab13 (Ang et al., 2004; Cramm-Behrens et al., 2008; Cresawn et al., 2007; Nokes et al., 2008; Zahraoui et al., 1994). Rab10 joue un rôle direct dans le retour à la membrane plasmique, tandis que Rab8 et Rab13 ont plus un rôle organisateur au niveau de l'endosome de recyclage (Babbey et al., 2006; Henry and Sheff, 2008). Le TfR transite du TGN vers la membrane plasmique de façon directe ou par les endosomes de recyclage, selon le degré de polarisation de la cellule, suggérant ainsi une réorganisation du trafic intercellulaire pendant la mise en place de la polarité (Gravotta et al., 2007). Le recyclage depuis les endosomes précoces peut faire intervenir les deux types de recyclage rapide et lent. Dans le cas du recyclage lent, les cargos peuvent être adressés du compartiment de recyclage commun vers la membrane basolatérale, alors que les cargos destinés à la membrane apicale vont être d'abord dirigés vers les compartiments de recyclage apicaux puis à la membrane plasmique apicale. De plus, deux autres petites GTPases, Rab17 (spécifiquement exprimée dans les cellules épithéliales) et Rab25 semblent impliquées dans des phénomènes de transcytose et sont retrouvées au niveau des endosomes de recyclage apicaux (Hunziker and Peters, 1998; Jerdeva et al., 2010; Tzaban et al., 2009).

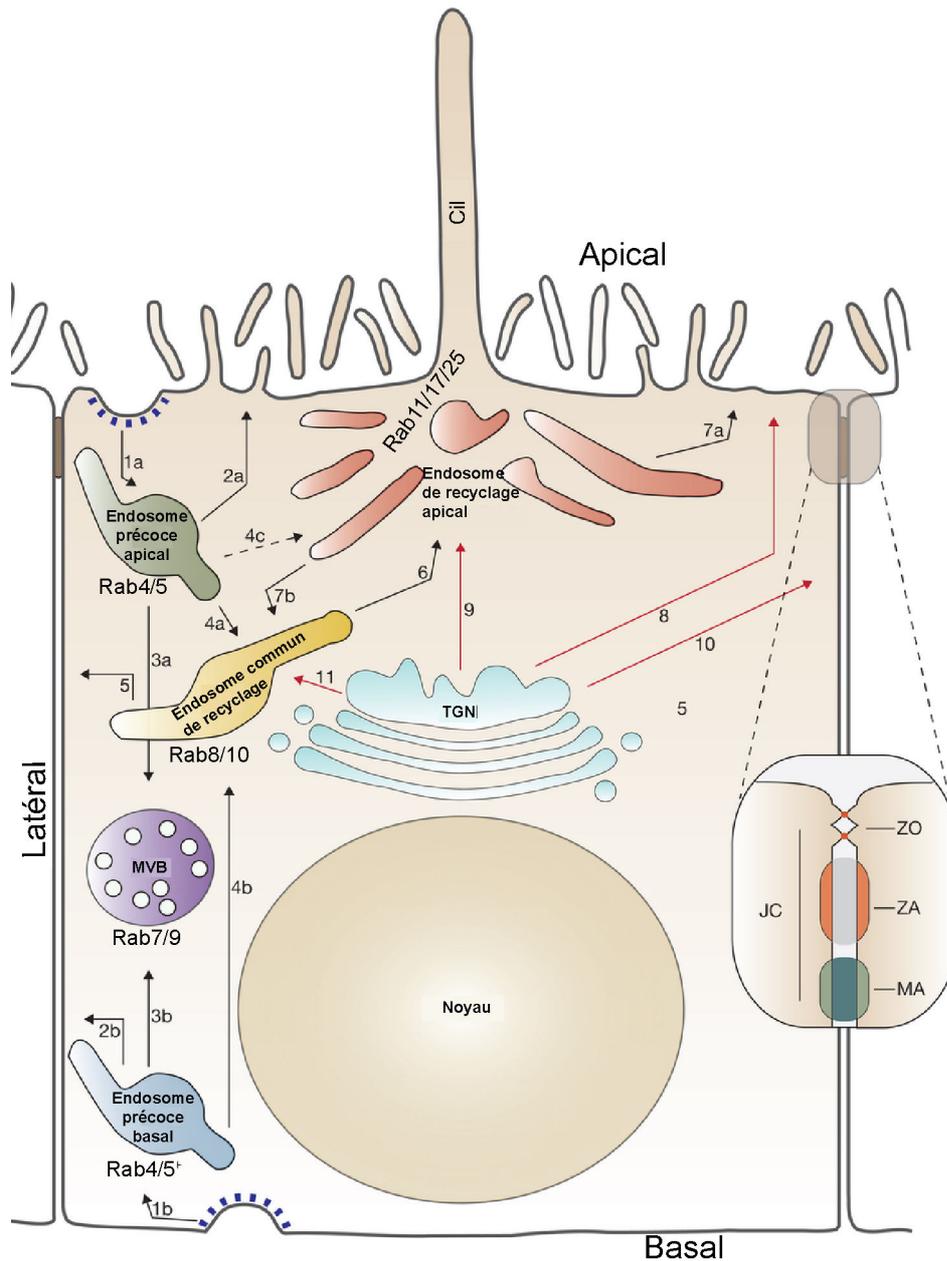


Figure 48 : Trafic intracellulaire dans une cellule polarisée.

Protéines, lipides et fluides sont internalisés depuis les membranes apicale (1a) ou basolatérale (1b) et atteignent les endosomes précoces apicaux ou les endosomes précoces basaux. Les cargos peuvent être recyclés à la surface cellulaire (2a/b) ou être adressés aux MVBs (3a/b), puis aux lysosomes, ou être convoyés vers les endosomes de recyclage communs (4a/b). Il pourrait également exister une voie directe allant des endosomes précoces apicaux vers les endosomes de recyclage apicaux (4c). Les cargos des endosomes de recyclage communs sont envoyés vers la surface de la cellule (5), ou vers les endosomes de recyclage apicaux (6), d'où ils pourront atteindre la membrane plasmique apicale (7a). La transcytose pourrait faire transiter ses cargos des endosomes de recyclage apicaux vers les endosomes de recyclage communs (7b). Lors de leur synthèse, au niveau du réticulum endoplasmique, les protéines atteignent le TGN, d'où elles peuvent être directement adressées à la membrane apicale (8) ou basolatérale (10) ou, indirectement, en passant par les endosomes de recyclage apicaux (9) ou communs (11). Les transports correspondant à l'endocytose sont représentés par des flèches noires et la voie de sécrétion par des flèches rouges. L'encart illustre un complexe de jonction intercellulaire (JC) composé

de la zonula occludens (ZO), de la zonula adherens (ZA) et de la macula adherens (MA). Adapté de (Apodaca et al., 2012).

vi) *Recyclage et métabolisme*

Les machineries de recyclage interviennent dans le transport de différents transporteurs/récepteurs des voies métaboliques. Le TfR, par exemple, joue un rôle primordial dans le métabolisme du fer ; il a été décrit *supra*. Le transporteur de glucose GLUT4 est également affecté, nous reviendrons plus en détail *infra*. Enfin le récepteur aux LDL (low density lipoproteins) est lui aussi soumis à des régulations par les machineries de recyclage. Une des seules protéines identifiées aujourd'hui dans le recyclage des LDLRs est la SNX17. Il a été démontré que la SNX17 s'associe au LDLR par un motif NPxY, mais qu'elle peut également s'associer avec d'autres récepteurs de la famille de LDL, incluant le récepteur aux LVLDL, LRP1 et ApoER2. La liaison de la SNX17 au LDLR accélère l'endocytose du récepteur d'un facteur 2, sans toutefois modifier le niveau d'expression en surface : ceci suggère que cette liaison n'affecte pas la dégradation du récepteur, mais accélère son mouvement à travers les compartiments de recyclage. L'autre facteur intervenant dans le recyclage des LDLRs est Rab13. En effet, cette GTPase module le trafic du récepteur entre le TGN et les endosomes de recyclage ; sa perturbation empêche le bon adressage du LDLR à la membrane plasmique basolatérale (Burden et al., 2004; Donoso et al., 2009; Shah et al., 2013; Sotelo et al., 2014; Stockinger et al., 2002; Yamamoto et al., 2003).

vii) *Machineries de recyclage et pathologies*

Les différentes protéines impliquées dans les machineries de recyclage sont donc sollicitées dans de nombreuses fonctions dans la cellule, ce qui renforce l'intérêt de les étudier afin de mieux comprendre les mécanismes. De plus, certaines d'entre elles, comme Rab4, ou Rab11 sont impliquées dans différentes pathologies. Rab4 (et Rab5) peuvent être impliquées dans le phénotype invasif d'une tumeur et favoriser sa dissémination (Frittoli et al., 2014). Rab11, qui est le centre organisateur du recyclage lent, est également impliquée dans la progression de maladies neurodégénératives comme Alzheimer ou Huntington, mais aussi dans des pathologies liées au métabolisme, tel que le diabète de type II. Rab25, qui est très

proche de Rab11, est impliquée dans de nombreux cancers (sein, colon, poumon, rein, prostate...). Rab11 peut, outre son implication directe dans des pathologies, être détournée de ses fonctions par des agents pathogènes intracellulaires, comme *Salmonella typhimurium*, *Salmonella flexneri*, *Chlamydia trachomatis* ou le virus Andes (Iversen et al.). Par exemple, la bactérie *Chlamydia trachomatis* détourne Rab11 et certains de ses effecteurs, afin de fragmenter le Golgi (Bhuin and Roy, 2015; Guichard et al., 2014; Hsiao et al., 2015; Welz et al., 2014).

Ces dernières années, de nouvelles protéines impliquées dans le trafic intracellulaire et le recyclage ont été identifiées. Les protéines MICAL-Like en font partie : nous allons maintenant décrire leurs rôles connus à ce jour.

4) Les protéines MICALs, une nouvelle famille impliquée dans l'endocytose

a) La famille de protéines MICALs

Les protéines MICALs pour « molecule interacting with CasL » sont une famille de protéines contenant plusieurs domaines conservée au cours de l'évolution. Elles s'expriment dans de nombreux tissus chez l'Homme (cerveau, poumon, foie, rein). La protéine humaine MICAL-1, et celle de *Drosophila melanogaster* Mical, furent découvertes en 2002 (Suzuki et al., 2002; Terman et al., 2002). MICAL-1 fut identifiée lors d'un crible des partenaires de CasL (d'où son nom) et lors de la recherche de molécules associées au domaine cytoplasmique des plexines. Les plexines sont les principaux récepteurs des sémaphorines. Ces molécules transmettent des signaux régulant différentes GTPases, comme Ras (les plexines possèdent dans leur queue C-terminale un domaine jouant le rôle de GAP pour Ras) ou Rho, et sont donc largement impliquées dans les modulations, du réseau de microtubules, du cytosquelette d'actine et de l'adhérence cellulaire. Ces récepteurs sont fortement impliqués au cours du développement cardio-vasculaire, neuronal, et osseux. Ils ont récemment été impliqués dans le système immunitaire, aussi bien au niveau physiologique (développement et migration des thymocytes, migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes secondaires, activation des

lymphocytes B...) que pathologique, notamment dans la carcinogenèse (Jongbloets and Pasterkamp, 2014; Muzes and Sipos, 2014).

Consécutivement à la découverte de MICAL-1, deux autres protéines (MICAL-2 et MICAL-3) (Figure 49) ont été identifiées chez l'Homme et les rongeurs. On retrouve 8 homologues chez le Poisson-zèbre.

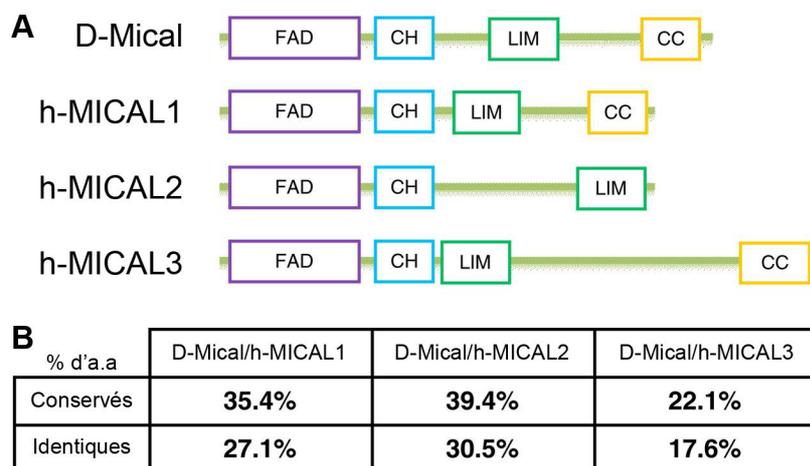


Figure 49 : Organisation des protéines MICALs humaines et de drosophile.

(A) Structure des différentes protéines MICALs humaines et (B) comparaison de séquences avec la protéine Mical de *Drosophila melanogaster*. Adapté de (Giridharan et al., 2012b).

Les protéines MICALs sont impliquées dans différents processus physiologiques et pathologiques. Chez la drosophile, Mical est impliquée dans le routage des axones, dans la distribution des boutons synaptiques, dans la taille des dendrites durant le développement neuronal, mais aussi dans la formation du poil et la distribution des myofilaments (Beuchle et al., 2007; Hung et al., 2010; Kirilly et al., 2009; Terman et al., 2002). Chez les vertébrés, les protéines MICALs jouent également un rôle dans le développement neuronal, dans la régénération du système nerveux central et dans les phénomènes d'apoptose et d'exocytose (Ashida et al., 2006; Bron et al., 2007; Fischer et al., 2005; Grigoriev et al., 2011; Morinaka et al., 2011; Pasterkamp et al., 2006; Schmidt et al., 2008; Weide et al., 2003; Zhou et al., 2011).

Outre ces protéines MICALs, un groupe de protéines MICAL-Like (Mical-L) a été décrit. Une seule protéine Mical-L est retrouvée chez la drosophile, deux chez l'Homme, MICAL-L1 et MICAL-L2 (aussi appelée JRAB) (Terai et al., 2006). Contrairement aux protéines MICALs, les MICAL-Ls ne possèdent pas de domaine monooxygénase à leur extrémité N-terminale. MICAL-L1 et MICAL-L2 présentent 30% d'homologie de séquence ; cependant MICAL-L1 possède deux motifs « NPF »

(asparagine proline phénylalanine), absents chez MICAL-L2 et chez toutes les protéines MICALs. Ces motifs permettent à MICAL-L1 de lier les protéines EHDs, impliquées dans le trafic membranaire (Figure 52).

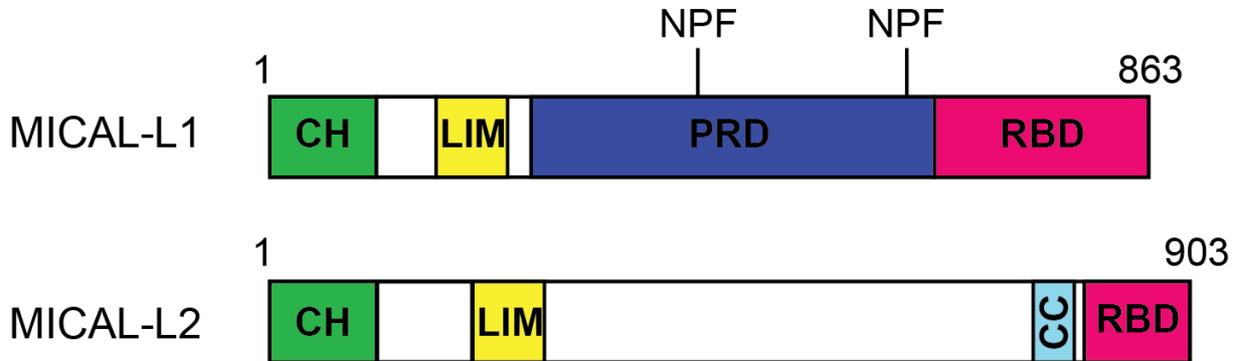


Figure 50 : Organisation des protéines MICAL-Ls.

CH : calponin homology, *LIM* : Lin11/Isl1/Mec3, *PRD* : proline rich domain, *RBD* : Rab binding domain, *CC* : coiled-coil.

b) Les différents domaines des protéines MICALs et MICAL-Ls :

i) Domaine monooxygénase

Situé en extrémité N-terminale, ce domaine flavoprotéine monooxygénase a une activité enzymatique qui catalyse l'addition d'un atome d'oxygène sur son substrat, avec comme cofacteurs la flavine et le couple NAD(P)H/NAD(P)^+ (Palfey and McDonald, 2010). Ce domaine contient un motif de liaison au FAD (flavin adenine dinucleotide), qui est retrouvé chez les autres protéines contenant un domaine flavoprotéine monooxygénase (Siebold et al., 2005). L'actine filamenteuse (F-actine) peut directement s'associer à ce domaine. Ce domaine est capable *in vitro* de dépolymériser des filaments d'actine en oxydant la méthionine en position 44 des unités globulaires d'actine. La méthionine en position 47 peut également être oxydée, mais sans impact sur la stabilité de l'actine polymérisée. La réversion de cet effet peut être induit par la protéine SelR (Hung et al., 2011; Hung et al., 2013). La mutation du domaine FAD de Mical perturbe la guidance axonale chez la drosophile. De même, chez l'Homme, les domaines FAD de MICAL-1 et MICAL-3 sont respectivement impliqués dans la guidance axonale et la fusion de vésicules de sécrétion à la membrane plasmique.

ii) Domaine calponin homology

Le domaine monooxygénase est suivi par un domaine calponin homology (CH). Ce domaine fut décrit pour la première fois dans la calponine, une protéine régulant la contractilité musculaire et la motilité dans les cellules non musculaires (Rozenblum and Gimona, 2008). Il existe 3 principaux types de domaine CH. Le type 1 peut directement lier l'actine, ce qui n'est pas le cas du type 2. Ce dernier possède en revanche un site de liaison au $PI(4,5)P_2$, intervenant dans la régulation de la F-actine. Le type 1 est principalement retrouvé dans des molécules du cytosquelette ou de signalisation. Le type 3 est retrouvé, en copie unique, sur des protéines de signalisation et du cytosquelette. En revanche, l'association des types 1 et 2, forme le domaine ABD (Actin-binding domain) de nombreux partenaires de la F-actine. Des études structurales ont démontré que le domaine CH des protéines de la famille MICAL est de type 2. Il ne lie donc pas directement l'actine, et n'est pas non plus nécessaire pour la liaison de Mical à la F-actine. Son rôle serait plutôt de faciliter la fixation du domaine monooxygénase à la F-actine. Enfin, ces études révèlent que la conformation tridimensionnelle de ce domaine pourrait être impliquée dans l'interaction avec d'autres protéines que l'actine (via des résidus hydrophobes) ; toutefois aucune étude n'a démontré à ce jour la nécessité du domaine CH pour l'interaction d'une protéine MICAL avec un de ses partenaires (Fraleley et al., 2005; Fukami et al., 1992; Gimona et al., 2002; Korenbaum and Rivero, 2002; Sun et al., 2006).

iii) Domaine LIM

Le domaine LIM (Lin11, Isl-1 and Mec3) est un autre domaine d'interaction avec des éléments du cytosquelette. Ce domaine jouerait le rôle de point d'attache pour d'autres protéines. Par exemple, le domaine LIM de MICAL-1 module les interactions avec CRMP-1 et les kinases NDR (nuclear Dbf-2 related). Ce domaine confère également une interaction intramoléculaire aux protéines MICALs. En s'associant avec l'extrémité C-terminale de la protéine, il la maintient dans une conformation d'auto-inhibition, bloquant les interactions avec de nombreux partenaires (Bach, 2000; Dawid et al., 1998; Schmidt et al., 2008; Zhou et al., 2011).

iv) Région riche en proline

Les régions riches en proline permettent à la fois la bonne conformation des protéines mais ont également un fort potentiel d'interaction avec d'autres protéines (Kay et al., 2000; Williamson, 1994). L'interaction de MICAL-1 et CasL se fait entre un motif PPKPP, présent dans la région riche en proline de MICAL-1, et le domaine SH3 de CasL. Ces régions varient d'une protéine MICAL à l'autre, et déterminent la spécificité d'interaction de certaines d'entre-elles. Ce même motif PPKPP n'est pas retrouvé dans MICAL-2 et MICAL-3.

v) Domaine en superhélices (« coiled-coil »)

Ce type de domaine est ubiquitaire et prend part à l'assemblage des protéines (Burkhard et al., 2001; Wolf et al., 1997). Chez les protéines de la famille MICAL, il est situé au niveau de l'extrémité C-terminale. C'est ce domaine qui maintient les protéines MICALs dans une conformation fermée, en liant le domaine LIM. De nombreuses protéines Rabs interagissent avec ce domaine (Rab1, Rab7, Rab8, Rab10, Rab13, Rab15, Rab35 et Rab36) et, de ce fait, les protéines MICALS sont considérées comme des effecteurs des Rabs. Pour cette raison, ce domaine sera dénommé RBD (Rabs binding domain) *infra*. Enfin, c'est aussi grâce à ce domaine que les protéines MICALs peuvent s'associer à différentes membranes plasmiques (Kobayashi et al., 2014b; Zahraoui, 2014).

c) Protéines MICALs, trafic membranaire et cytosquelette d'actine.

i) MICAL3 et fusion des vésicules d'exocytose

Comme nous venons de le voir, les protéines MICALs sont capables de s'associer avec plusieurs Rabs. Rab6 et Rab8 interviennent avec MICAL-3 dans le processus d'ancrage et de fusion de vésicules de sécrétion. Rab6, localisée au niveau du Golgi-TGN, intervient dans l'adressage des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique. Dans un premier temps, Rab6 recrute Rab8 au niveau de ces vésicules, puis Rab8, en association avec MICAL-3, interagit avec la protéine ELKS. La protéine ELKS est une protéine corticale qui permet l'ancrage des vésicules d'exocytose à la membrane plasmique. Une fois associée à Rab8 et MICAL-3,

l'ensemble facilite la fusion des vésicules avec la membrane plasmique. Deux sites distincts contenus dans le domaine RBD de MICAL-3 sont responsables de la formation de ce complexe. En conclusion, l'interaction de Rab6 avec le complexe Rab8-MICAL3-ELKS promeut la fusion de vésicules sécrétoires (Grigoriev et al., 2011).

ii) MICAL et croissance du cône axonal

Lors du développement neuronal, la guidance des axones est soumise à des phénomènes de chimio-attraction et chimio-répulsion. Ceci implique des remodelages rapides et efficaces de la membrane et du cytosquelette d'actine ; ces remodelages sont synchronisés avec des événements d'endocytose et d'exocytose. L'interaction des plexines avec les sémaphorines provoque une rétraction du cône en cours d'extension. Cette rétraction est associée à une dépolymérisation rapide d'actine. Les protéines MICALs peuvent s'associer aux sémaphorines, mais aussi à la F-actine, et induire sa dépolymérisation directe. Lors du contact sémaphorine/plexine, MICAL est alors recrutée et peut dépolymériser l'actine au niveau du cône, induisant la rétractation du cône. MICAL joue un rôle de plateforme, reliant le cytosquelette avec un couple ligand/récepteur (Figure 51). En revanche, aucune étude n'a démontré, à l'heure actuelle, l'implication potentielle de MICAL dans les événements d'endocytose et d'exocytose qui se produisent en parallèle de la rétraction du cône (Hung et al., 2010; Mann and Rougon, 2007; Nadella et al., 2005).

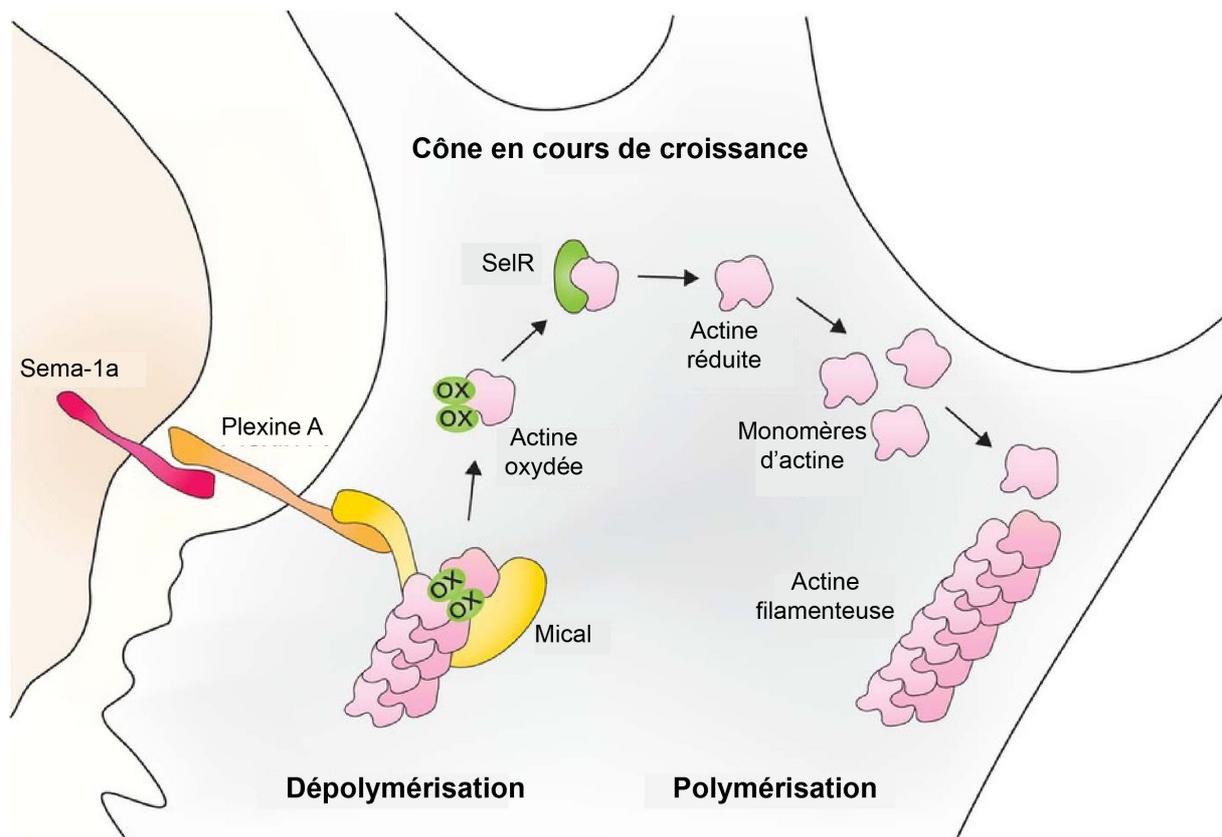


Figure 51 : Schéma d'action de Mical-SelR dans la rétraction du cône axonal.

La sémaphorine-1a (rouge) transmet un signal à travers la plexine A (orange) pour induire la dépolymérisation des filaments d'actine (rose) dépendante de Mical (jaune), ce qui entraîne la rétraction du filopode. L'actine oxydée (Ox) est réduite par SelR (vert) et recyclée dans le cytosol, disponible pour de nouveaux événements de polymérisation. Les réactions de polymérisation/dépolymérisation aux antipodes du cône permettent son éloignement de la source répulsive. Adapté de (Aberle, 2013).

d) Rôles des protéines MICAL-Ls dans le trafic membranaire

i) MICAL-L2 et recyclage membranaire

MICAL-L2, exprimée de façon exogène dans des cellules HeLa, est localisée dans des vésicules alignées le long des câbles d'actine (Figure 52). C'est un effecteur de Rab13 et Rab8 qui intervient dans l'assemblage des jonctions serrées et adhérentes, en régulant le recyclage des occludines, claudines et E-cadhérines vers la membrane plasmique (Sakane et al., 2012; Sakane et al., 2013; Terai et al., 2006; Yamamura et al., 2008). MICAL-L2 est recrutée au niveau des jonctions intercellulaires, par la protéine α -actinine-4 (Nakatsuji et al., 2008). En dehors de l' α -actinine-4, MICAL-L2 peut également s'associer avec l' α -actinine-1. Les

α -actinines sont des protéines localisées au niveau des fibres de stress, des protrusions cellulaires et des sites d'adhésion ; elles sont capables d'organiser les filaments d'actine en faisceau (Sjoblom et al., 2008).

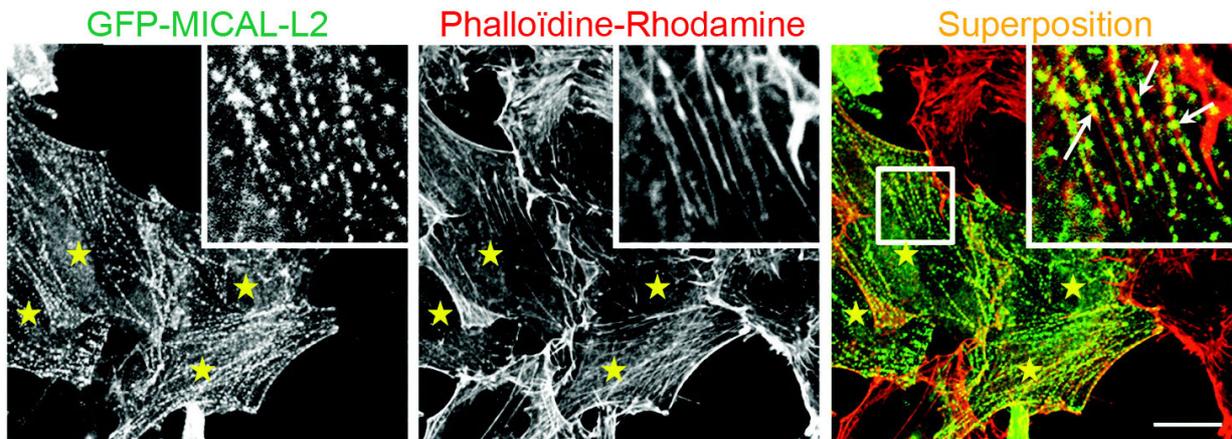


Figure 52 : MICAL-L2 est localisée le long des filaments d'actine.

Images de microscopie à fluorescence de cellules HeLa qui expriment de façon transitoire GFP-MICAL-L2 et dont les filaments d'actine ont été immunomarqués à l'aide de la phalloïdine-rhodamine. Les cellules transfectées sont indiquées avec une étoile jaune. La colocalisation entre les vésicules de MICAL-L1 et les filaments d'actine est indiquée par des flèches blanches sur la superposition des deux canaux de fluorescence. Barre d'échelle 10 μ m. Adapté de (Giridharan and Caplan, 2014)

MICAL-L2 a, elle aussi, la capacité de lier directement l'actine et permet de stabiliser les câbles. En effet, une perte de MICAL-L2 entraîne un relâchement de ces derniers. Lorsque MICAL-L2 est sous sa conformation fermée, elle n'interagit pas avec les filaments d'actine ; en revanche, lorsque la protéine est activée, sa liaison avec l' α -actinine-4 empêche celle-ci de lier et d'organiser les câbles d'actine. MICAL-L2 a donc plusieurs rôles vis à vis de l'actine et est indispensable pour l'établissement et le maintien des contacts intercellulaires (Figure 53).

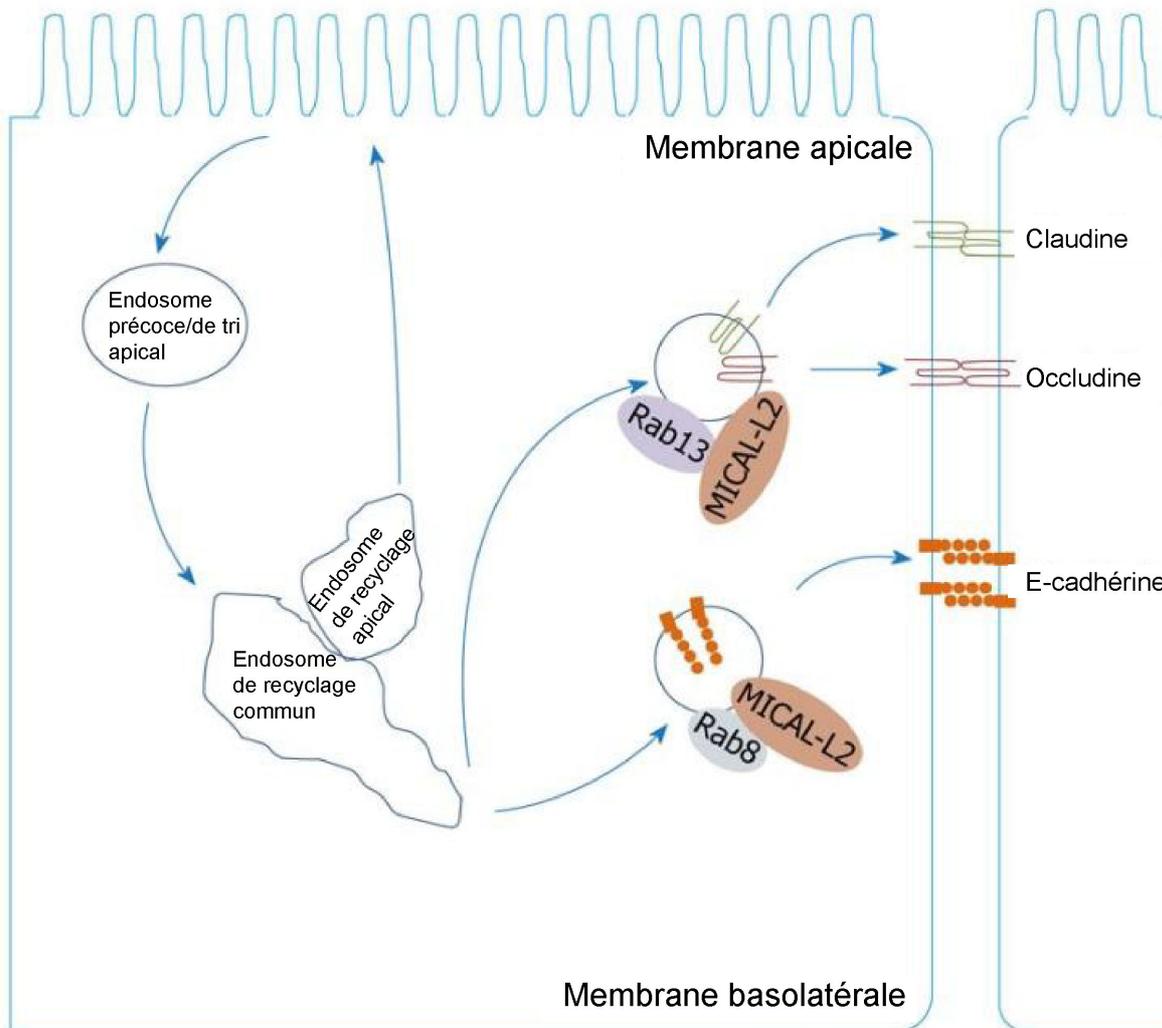


Figure 53 : MICAL-L2 dans le recyclage des molécules d'adhésion.

L'interaction de MICAL-L2 et Rab13 contrôle le transport des claudines-1 et occludines à la membrane plasmique, alors que le complexe MICAL-L2/Rab8 régule le recyclage des E-cadhérines. Adapté de (Rahajeng et al., 2010a).

D'autres phénomènes, comme la croissance des neurites, la dispersion des cellules épithéliales, l'étalement cellulaire et la sécrétion de vésicules GLUT4, font intervenir MICAL-L2 (Kanda et al., 2008; Sakane et al., 2013; Sakane et al., 2010). Dans le cas de l'étalement cellulaire, MICAL-L2 réarrange le cytosquelette d'actine de façon indépendante des α -actinines, en interagissant avec les filamines. En revanche, l'implication de MICAL-L2 dans la translocation des vésicules GLUT4 fait intervenir, en partie, le même mécanisme moléculaire : Rab13 est activée dans la cascade de signalisation du récepteur à l'insuline, qui va ensuite recruter MICAL-L2 qui recrute à son tour l' α -actinine-4, permettant ainsi un réarrangement du cytosquelette d'actine

et facilitant l'arrivée des vésicules GLUT4 à la membrane plasmique (Figure 54) (Antonescu et al., 2014; Foley and Klip, 2014; Klip et al., 2014; Sun et al., 2014).

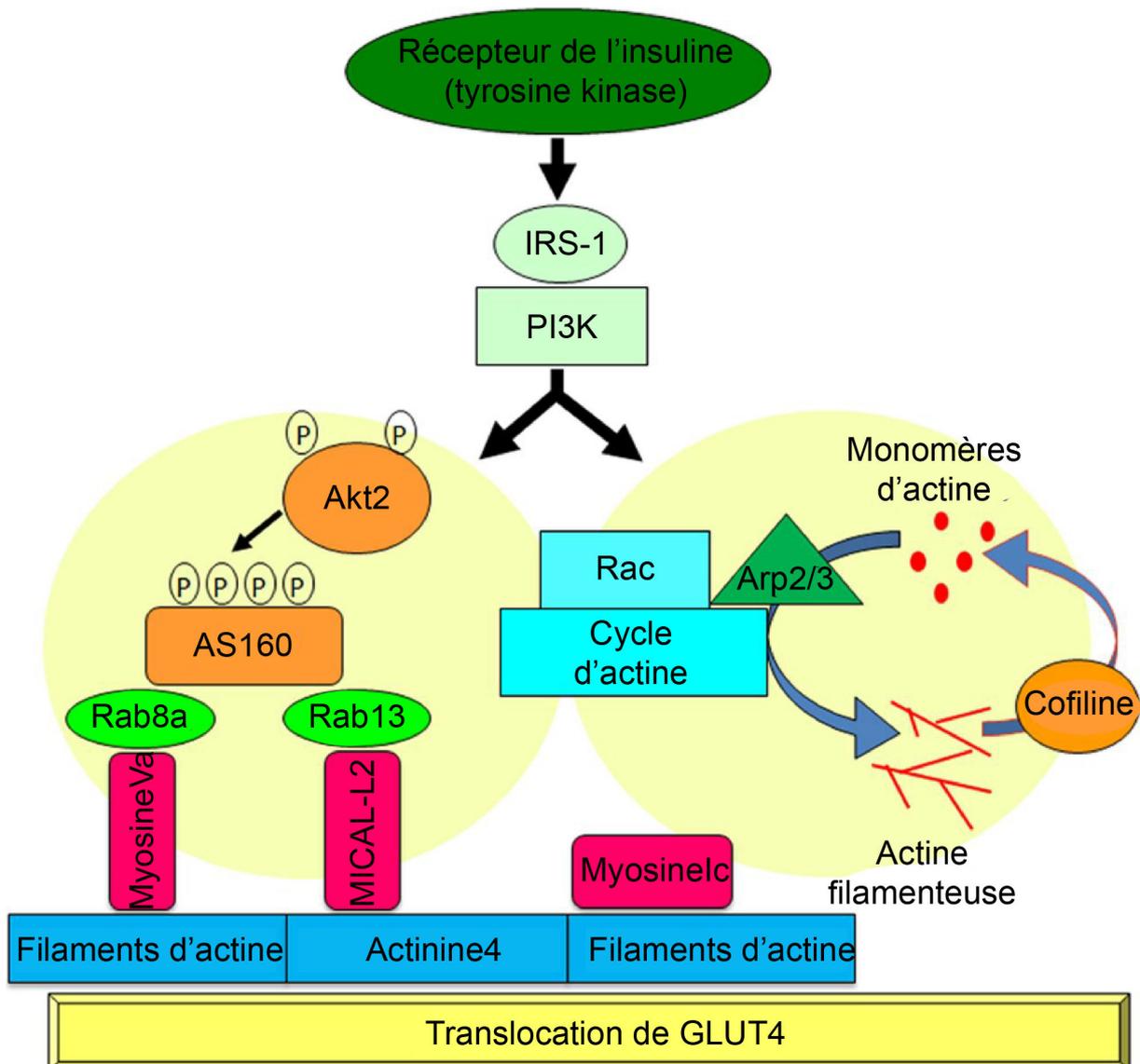


Figure 54 : MICAL-L2 dans la signalisation du récepteur à l'insuline dans les cellules musculaires.

La signalisation de l'insuline entraînant la translocation des vésicules contenant GLUT4 est composée de 2 branches principales : Une voie d'activation de Rac et une voie d'activation d'Akt2. La voie d'activation de Rac contrôle la polymérisation d'actine et génère des zones d'ancrage au niveau de la membrane plasmique. La voie d'activation d'Akt2 permet de connecter AS160 avec les protéines Rab8 et Rab13, lesquelles engagent le moteur moléculaire myosine Va, MICAL-L2, et la protéine d'attache myosine 1C. Ceci permet de connecter tout le système au cytosquelette d'actine ainsi qu'à ses régulateurs et d'induire la translocation des vésicules contenant GLUT4 à la surface des cellules musculaires en réponse à la stimulation par l'insuline. Adapté de (Klip et al., 2014)

ii) MICAL-L1 et la dégradation de l'EGFR

Dans les cellules épithéliales polarisées, MICAL-L1 est associée aux endosomes contenant Rab7, Rab8 et Rab13. Dans ces cellules, l'absence de MICAL-L1 n'affecte pas la distribution des protéines des jonctions intercellulaires. En revanche, la cinétique de dégradation de l'EGFR est affectée. L'extinction de MICAL-L1 entraîne une stimulation de la dégradation du récepteur ; sa surexpression entraîne un blocage partiel du récepteur dans les compartiments Rab7 (Figure 55). Cette étude a également permis de mettre en évidence l'interaction intramoléculaire du domaine LIM de MICAL-L1 avec son domaine RBD C-terminal. L'action de Rab13 permet de lever cette inhibition et activerait l'interaction de MICAL-L1 avec d'autres partenaires. (Abou-Zeid et al., 2011).

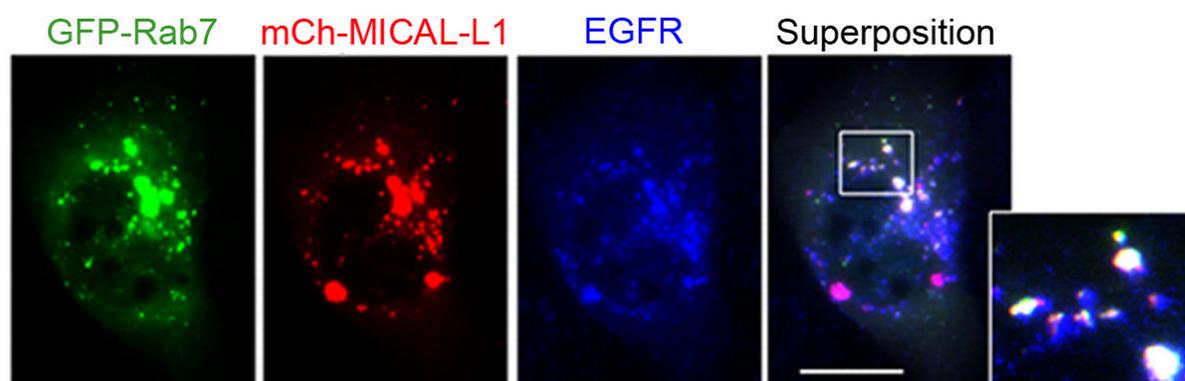


Figure 55 : Colocalisation de l'EGFR dans les compartiments Rab7-MICAL-L1.

Cellules MDCK coexprimant mCherry-MICAL-L1 (rouge) et GFP-Rab7 (vert) stimulées pendant 15 min avec de l'EGF, qui est ensuite chassé pendant 3 h. Les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées avec un anti-EGFR (bleu). La triple colocalisation est indiquée par la couleur blanche. L'EGFR est fortement accumulé dans les compartiments contenant mCherry-MICAL-L1. Un chevauchement partiel des 3 compartiments est observé, montrant une accumulation d'EGFR dans les compartiments tardifs des cellules MDCK. Barre d'échelle 10 μ m. Adapté de (Abou-Zeid et al., 2011)

iii) Partenaires de MICAL-L1

MICAL-L1 est une protéine exprimée dans de nombreux types cellulaires. La protéine est localisée au niveau de vésicules et de tubules dans la cellule. Grâce à ses motifs NPF, MICAL-L1 a la capacité de s'associer avec la protéine EHD1 qui est localisée au niveau des mêmes tubules, qui émanent des endosomes de recyclage. Comme il a été discuté *supra*, EHD1 joue un rôle important dans le recyclage de certains récepteurs, comme la β 1-intégrine, et serait notamment impliquée dans la

fission des vésicules de recyclage. En l'absence de MICAL-L1, la protéine EHD1 présente un défaut de recrutement au niveau des compartiments tubulaires, impliquant la protéine MICAL-L1 dans le recrutement d'EHD1. Cependant, le rôle de ce couple de protéines dans des phénomènes de recyclage plus généraux comme le TfR n'a pas été précisément étudié. De plus, MICAL-L1 est aussi un effecteur de Rab8, qui colocalise au niveau des mêmes tubules qu'EHD1. L'interaction de Rab8 avec MICAL-L1 faciliterait donc le recrutement d'EHD1 et servirait d'intermédiaire entre Rab8 et EHD1. En terme de cinétique d'interaction, il n'est pas clairement prouvé que Rab8 recrute MICAL-L1 ou que, d'une façon non conventionnelle, MICAL-L1 recrute Rab8 au niveau de compartiments tubulaires. La génération de ces tubules fait intervenir la PACSINE2 (ou syndapine2), une protéine à domaine BAR, qui a la capacité d'interagir à la fois avec MICAL-L1 et avec EHD1. De plus, PACSINE2 et MICAL-L1 ont toutes deux la capacité de lier l'acide phosphatidique. Le modèle actuel suggère que l'acide phosphatidique initie la tubulation en recrutant MICAL-L1 et PACSINE2. Chacune de ces protéines sert ensuite de plateforme pour recruter d'autres effecteurs, comme, par exemple, le facteur WASP qui lie directement la PACSINE2 et permet de moduler la polymérisation d'actine.

iv) MICAL-L1 et croissance des neurites

La stimulation des neurones par le NGF (neuronal growth factor) induit une forte croissance des neurites. Ce procédé fait intervenir la protéine Rab35. En effet, la stimulation par le NGF induit une relocalisation de Rab35 au niveau de compartiments de recyclage positifs pour Arf6. Une fois relocalisée, Rab35 recrute MICAL-L1, qui peut jouer son rôle de plateforme d'interaction et recruter à son tour d'autres Rabs, comme Rab8, Rab13 et Rab36 au niveau des compartiments de recyclage (Figure 56). Dans les cellules neuronales stimulées par le NGF, le processus de croissance des neurites implique donc un schéma non conventionnel des Rabs et de leurs effecteurs. En effet, Rab35 joue le rôle de « super » Rab capable de recruter et activer son effecteur MICAL-L1 au niveau des compartiments de recyclage ; MICAL-L1, effecteur de Rab8, Rab13 et Rab36, est ensuite capable de les recruter à son tour. Il est rare de voir un effecteur recruter, au niveau d'un compartiment, sa propre Rab. C'est toutefois ce qui semble être observé ici, avec une hiérarchisation des interactions de MICAL-L1 avec différentes Rabs. Ceci laisse

supposer que, dans la cellule, l'affinité de MICAL-L1 pour les différentes Rabs est variable d'un processus à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'interaction avec Rab35 est un prérequis pour l'association/recrutement de Rab8, Rab13 et Rab36 (Kobayashi et al., 2014a; Kobayashi et al., 2014b; Kobayashi and Fukuda, 2012; Kobayashi and Fukuda, 2013b). En plus de l'implication de MICAL-L1, une autre étude a démontré le rôle de MICAL-L2 et Rab13 dans la croissance des neurites (Sakane et al., 2010).

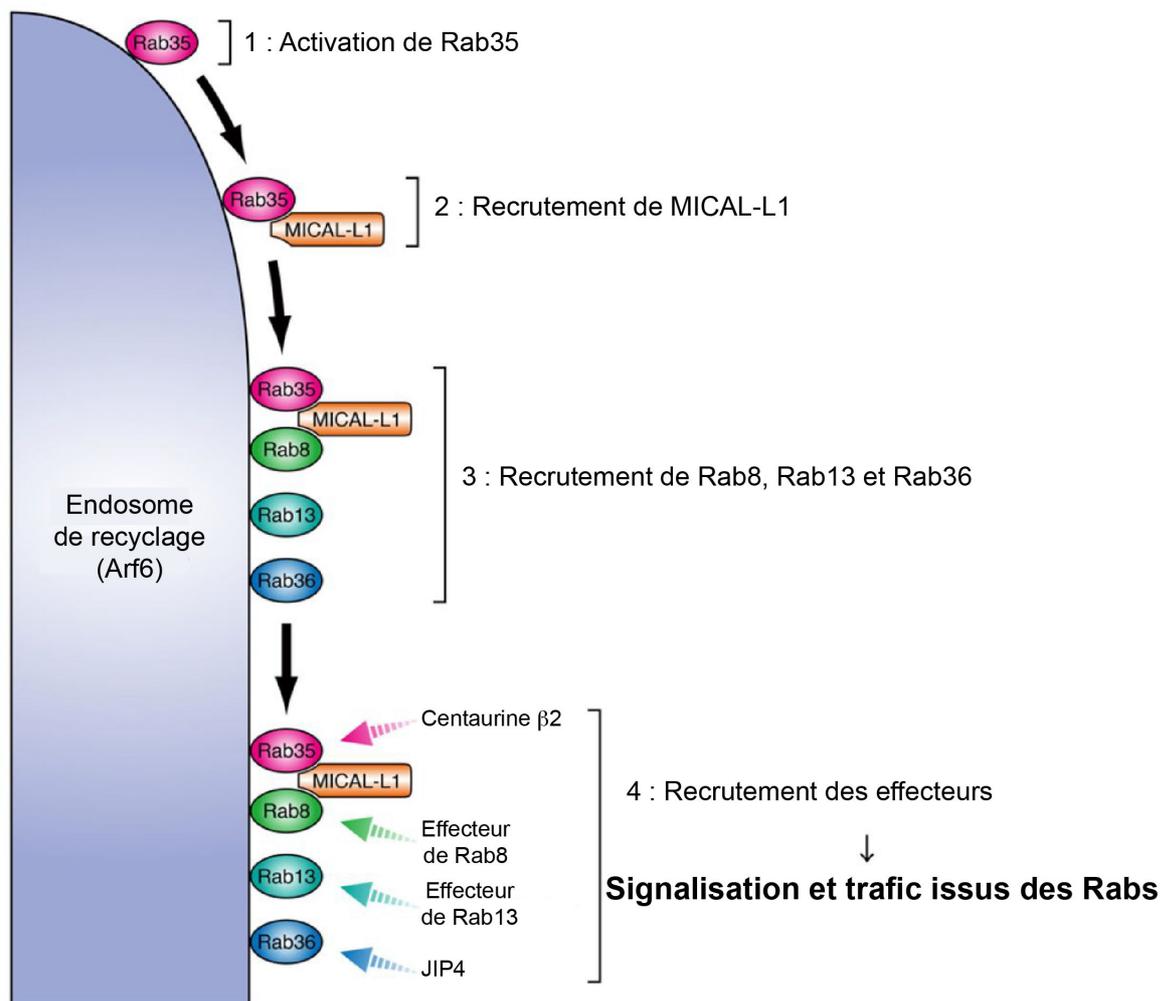


Figure 56 : Recrutement de MICAL-L1 par Rab35 au niveau des compartiments Arf6 et cascade de signalisation.

En réponse à la stimulation par le NGF, Rab35 s'accumule au niveau des compartiments de recyclage périnucléaires (contenant Arf6). Rab35 recrute ensuite MICAL-L1, qui sert d'échafaudage pour Rab 8, 13 et 36. Ces Rabs recrutent ensuite leurs effecteurs au niveau des mêmes compartiments de recyclage. Il en résulte une plateforme de signalisation, massive, simultanée et locale des Rabs. Adapté de (Kobayashi et al., 2014b).

v) MICAL-L1 et mitose

Comme nous l'avons vu *supra*, Rab35 est impliquée dans des phénomènes de recyclage, mais également dans des processus plus larges comme la cytokinèse. Une étude très récente a montré l'implication de MICAL-L1 et EHD1 dans la division cellulaire (Figure 57). En effet, leur extinction perturbe le cycle cellulaire dans des cellules HeLa et engendre une augmentation du nombre de cellules binucléées. MICAL-L1 et EHD1 permettent l'apport de vésicules issues de compartiment de recyclage au niveau du site d'abscission. Cependant, le recrutement de MICAL-L1 au niveau du pont reliant les cellules mère et fille est indépendant d'EHD1, Rab11 ou Rab35 ; aucun facteur n'a été identifié comme intervenant dans ce recrutement. Enfin, en sus du processus d'abscission, MICAL-L1 et EHD1 jouent aussi un rôle dans la formation du fuseau mitotique. Rab35 et EHD1 semblent moduler l'orientation du fuseau, tandis que MICAL-L1 contrôle sa longueur. Cependant, aucun mécanisme moléculaire n'a été formellement mis en lumière dans cette étude (Reinecke et al., 2015).

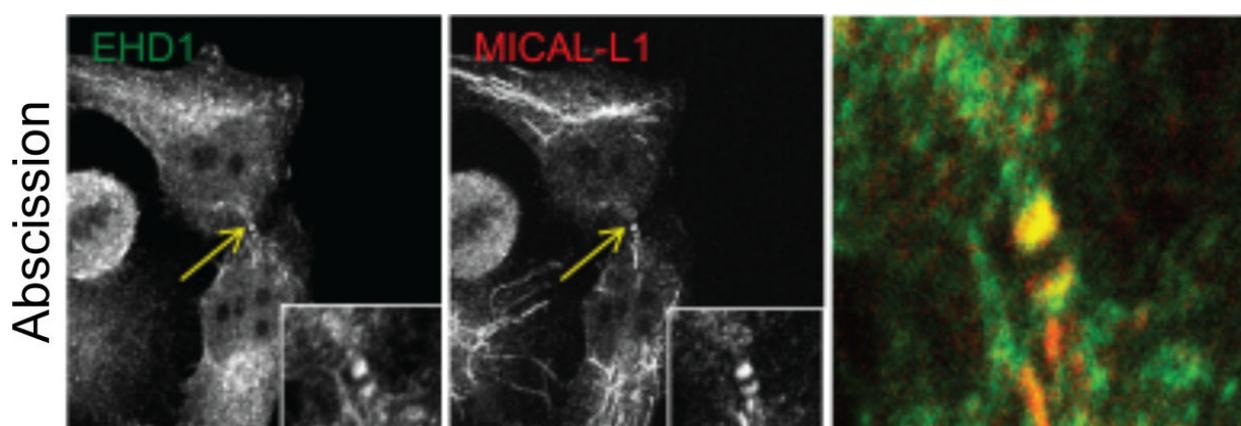


Figure 57 : Colocalisation des protéines EHD1 et MICAL-L1 au niveau du site d'abscission.

Cellules HeLa comarquées avec des anticorps anti-EHD1 (vert) et anti-MICAL-L1 (rouge). La superposition des 2 canaux (cadre de droite) est indiquée par la couleur jaune. Il est possible d'observer ici une colocalisation d'EHD1 et MICAL-L1 lors des phases tardives de la cytokinèse, au niveau du pont intracellulaire. Barre d'échelle 10 μ m. Adapté de (Reinecke et al., 2015)

Quelques études de crible ont montré que MICAL-L1 (mais aussi MICAL-L2), qui présente de nombreux sites de phosphorylation, peut interagir avec le domaine PBD (polo-box-domain) de la kinase Plk1 (Polo-like kinase 1) par l'intermédiaire de

sérines et thréonines phosphorylées. Cette kinase, intervenant dans le cycle de division cellulaire, pourrait donc être recrutée par MICAL-L1. De plus, MICAL-L1 peut être phosphorylée par la Cdk2 (cyclin-dépendant kinase 2), qui régule la progression du cycle cellulaire. (Chi et al., 2008; Lowery et al., 2007). Ces informations confortent le rôle de MICAL-L1 dans le processus de division cellulaire.

MICAL-L1 est donc une protéine capable d'interagir avec de nombreuses Rabs et, dès lors, potentiellement impliquée dans divers processus cellulaires. Outre les interactions avec les GTPases, MICAL-L1 est aussi capable de recruter de nombreux effecteurs, tels que les EHDs et les PACSINs.

5) Les PACSINs et EHDs, effecteurs de MICAL-L1 et leur implication dans les déformations membranaires

a) Les PACSINs

Les PACSINs (protein kinase C and casein kinase II interacting proteins), ou syndapines, sont des protéines à domaines F-BAR (Fes-CIP4 homology Bin-amphiphysin-Rvs) et SH3. Le domaine SH3 est responsable de l'auto-inhibition des PACSINs via une interaction intramoléculaire avec le domaine BAR. Quand l'auto-inhibition est levée, le domaine SH3 permet de nombreuses interactions protéiques. Il existe trois isoformes chez les mammifères. La PACSIN1 est exprimée dans les neurones et les cellules dendritiques plasmacytoïdes, alors que la PACSIN3 est principalement exprimée dans le cœur, les muscles squelettiques et le foie. La PACSIN2 est exprimée de façon ubiquitaire dans tous les tissus (Esashi et al., 2012; Qualmann et al., 1999; Ritter et al., 1999; Sumoy et al., 2001). Les trois isoformes ont pour partenaires communs la dynamine, la synaptojanine, la synapsine et N-WASP. Seules les PACSIN1 et 2 possèdent des motifs NPF, leur permettant de s'associer avec les protéines EHDs (Figure 58).

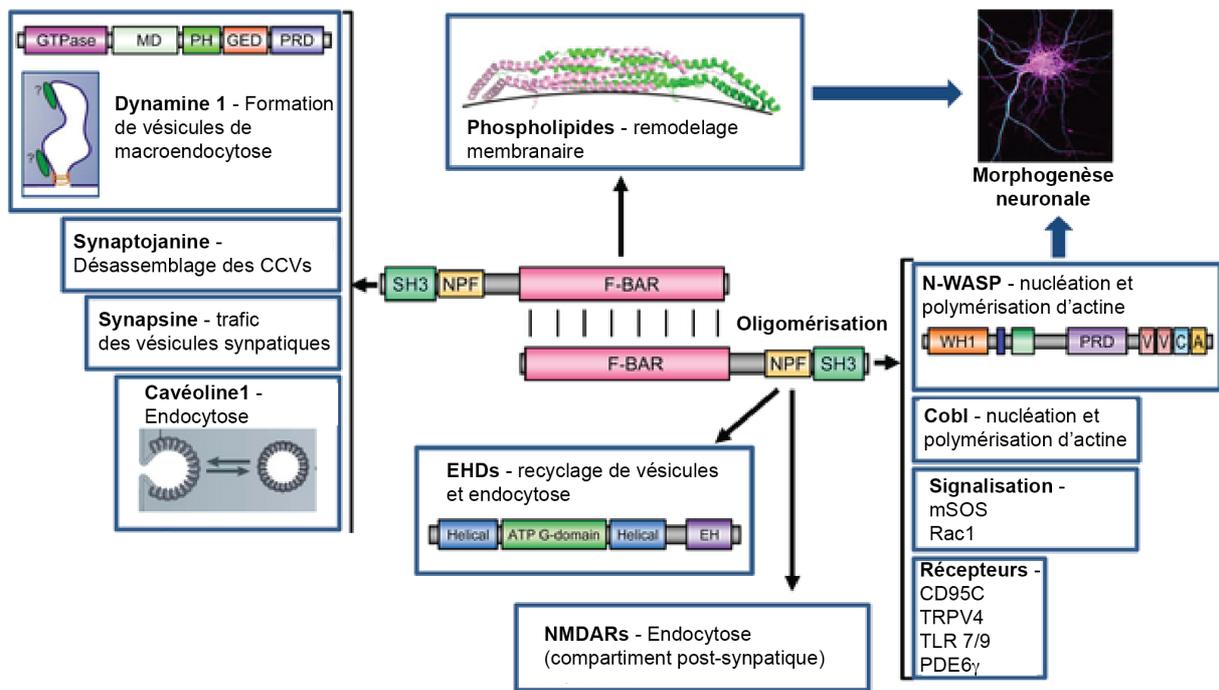


Figure 58 : Organisation des PACSINES et interactions connues.

Les flèches indiquent les interactions connues des différents domaines des PACSINES (sans précision sur l'isoforme impliquée) ainsi que leurs fonctions. La protéine peut s'oligomériser de façon autonome grâce à son domaine F-BAR, ce qui permet à la protéine d'interagir avec de nombreux partenaires et d'avoir différentes fonctions au sein d'un même type cellulaire (PH, pleckstrin homology; MD, middle domain; GED, GTPase effector domain; TLR7/9, toll-like receptor 7/9; PDE6c, phosphodiesterase 6 gamma; NR3A, NMDA receptor subunit 3A; WH1; WASP-homology 1 domain; V, verprolin-homology domain; C, cofilin-homology domain; A, acidic domain). Adapté de (Quan and Robinson, 2013).

Toutes les PACSINES ont un rôle dans le trafic membranaire et sont capables d'inhiber l'endocytose et de réorganiser le cytosquelette d'actine par leur interaction avec N-WASP (Modregger et al., 2000; Qualmann and Kelly, 2000). La PACSINE1 intervient dans l'endocytose spécifique donnant naissance aux vésicules pré-synaptiques, appelée macroendocytose (ou « bulk endocytosis »), en incorporant des volumes plus grands que l'endocytose dépendante de la clathrine. La PACSINE2 est impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine, dans la formation des cavéoles, le trafic golgien, le trafic des endosomes de recyclage et la migration cellulaire (Andersson et al., 2008; Anggono et al., 2013; Hansen et al., 2011; Meng et al., 2011; Schneider et al., 2014; Wu et al., 2014; Yao et al., 2014). Nous étudierons *infra* la PACSINE3, après avoir évoqué au préalable le rôle des protéines BAR dans la cellule.

i) Les protéines à domaine BAR

Les protéines à domaine BAR sont réparties en trois classes selon leur séquence : BAR (N-BAR), F-BAR et I-BAR. Toutes ces protéines sont composées d'un faisceau d'hélices. Les trois hélices d'un monomère sont capables de se dimériser, pour former un faisceau à six hélices, qui leur procure un degré spécifique de courbure intrinsèque, en forme caractéristique de banane. La surface du dimère est enrichie en résidus chargés positivement, qui vont permettre la reconnaissance du site de contact avec la membrane. Cette dernière contient des lipides chargés négativement. À l'exception des domaines I-BAR, ce site de contact est retrouvé du côté concave du dimère. *In vitro*, toutes ces protéines sont capables d'induire la tubulation de membrane. Puisqu'il est difficile de différencier les mesures de reconnaissance des membranes et de déformation, nous ne savons pas aujourd'hui si, dans le contexte cellulaire, les domaines BAR jouent un rôle de déformation directe des membranes ou si ils reconnaissent les membranes avant de recruter des protéines capables de former des tubules membranaires. Certaines protéines à domaine BAR, comme les PACSINE1 et 2 (mais pas la PACSINE3), possèdent des hélices amphipathiques permettant leur insertion dans les membranes. Ces hélices procurent la capacité aux protéines de former des vésicules à partir de tubules. Même si les protéines à domaine BAR sont connues pour former des tubules, la présence de ces insertions membranaires leur permet également de générer des vésicules, selon la concentration de la protéine considérée et du nombre d'hélices amphipathiques qu'elle possède. La PACSINE3 est donc la seule des trois isoformes à ne générer que des tubules.

En dehors des protéines à domaine BAR, d'autres types de domaines sont capables d'induire la courbure des membranes (domaine ENTH) ou de s'insérer dans les membranes (domaine PH). Les différentes déformations membranaires se produisant dans la cellule, ainsi que les différents modes d'action de déformation membranaire, sont résumés dans les figures 59 et 60 (McMahon and Boucrot, 2015; Suetsugu et al., 2014).

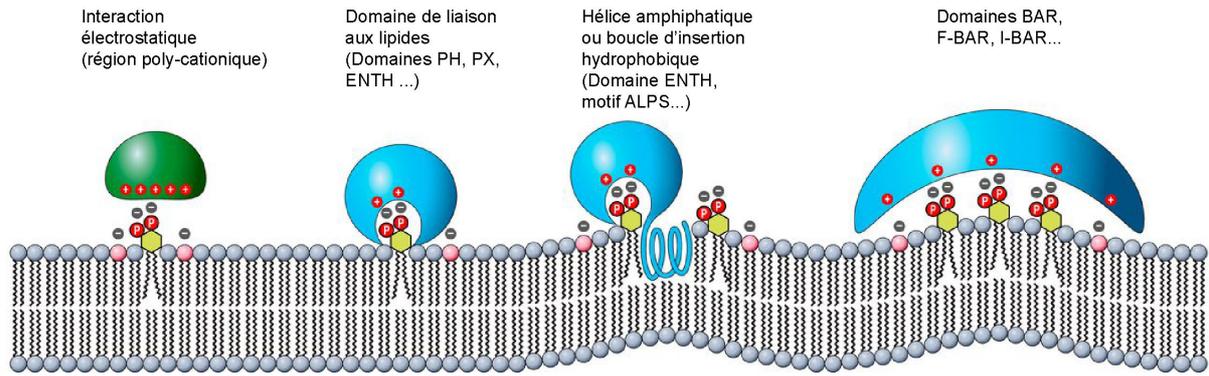


Figure 59 : Modes de déformation des membranes.

Les domaines protéiques, capables de reconnaître et de lier les lipides, sont classés en 4 catégories (décrites de gauche à droite). (1) Interaction simple, dépendante des charges de la protéine sans reconnaissance spécifique de lipide. (2) Domaines de reconnaissance spécifique de lipides. (3) Reconnaissance de la membrane et insertion d'hélices amphipathiques ou de boucles hydrophobiques. (4) Protéines dont la structure permet la déformation membranaire (protéines à domaine BAR). Adapté de (Suetsugu et al., 2014)

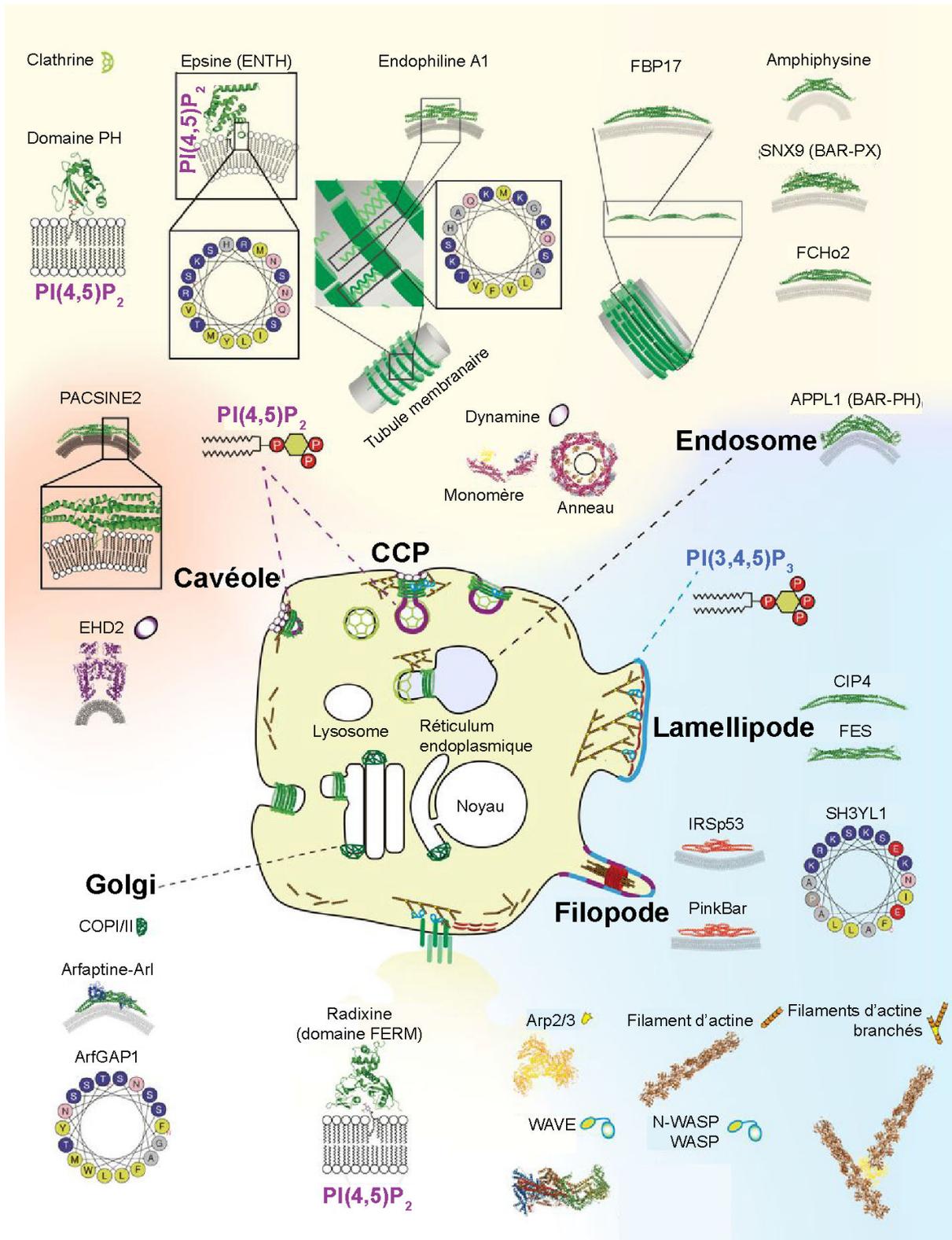


Figure 60 : Vue globale des protéines et domaines induisant des déformations membranaires dans la cellule.

Les déformations membranaires sont nécessaires dans de nombreux processus cellulaires présentés ici : l'endocytose (formation des cavéoles et CCPs), le tri endosomal, la formation de vésicules de sécrétion au niveau du Golgi et la formation de structures impliquées dans l'adhérence et la migration cellulaire (lamellipode et filopode). Les principaux acteurs sont

illustrés dans chacun cas évoqués supra, ainsi que le type de phosphoinositide mis en jeu. Adapté de (Suetsugu et al., 2014).

ii) Fonctions de la PACSINE3

La PACSINE3 module le trafic du transporteur de glucose GLUT1 dans les adipocytes. De plus, GLUT1 a été identifié comme cargo associé aux compartiments de recyclage dépendant de la voie Arf6, ce qui suggère l'existence d'une fonction de la PACSINE3 au niveau des endosomes et de, façon non exclusive, aux cargos internalisés par la voie dépendante de la clathrine (Eyster et al., 2009; Roach and Plomann, 2007). La PACSINE3 régule également TRPV4, un canal à cations qui répond à des stimuli incluant les forces mécaniques, la température et la liaison de son ligand. La PACSINE3 lui sert de protéine auxiliaire, capable d'influencer sa localisation subcellulaire et ses fonctions. L'association de TRPV4 à la membrane plasmique est modifiée dans des cellules rénales lorsque les cellules sont soumises à la chaleur, à un choc hypotonique ou activées par l'acide arachidonique (Cuajungco et al., 2006; D'Hoedt et al., 2008). Enfin, les dernières études réalisées montrent que la PACSINE3 a un effet spécifique, que n'ont ni la PACSINE1, ni la PACSINE2 dans la sécrétion de neurotransmetteurs dans les cellules neuroendocrines de souris (Quan and Robinson, 2014; Samasilp et al., 2014).

b) Les protéines EHDs

Les protéines EHDs (C-terminal Eps15 homology domain), sont au nombre de 4 chez les mammifères et régulent les différentes étapes du transport intracellulaire. Ces protéines partagent avec les Rabs des effecteurs communs et sont caractérisées par la présence d'un domaine EH (epsin homolgy) capable d'interagir avec des motifs NPF et un domaine GTPase, ressemblant à celui de la dynamine. Les protéines EHDs peuvent donc former des oligomères et être associées à des évènements de tubulation et fission membranaires.

EHD1 est le membre qui présente la plus grande homologie de séquence avec le seul orthologue retrouvé chez les invertébrés, ce qui peut expliquer qu'il soit le mieux caractérisé aujourd'hui. EHD1 intervient dans le recyclage d'un grand nombre de récepteurs : le récepteur à la transferrine, le CMH-I, la β -intégrine, le transporteur de glucose GLUT4, les AMPARs, le CMH-II (Caplan et al., 2002; Guilherme et al.,

2004b; Jovic et al., 2007; Lin et al., 2001; Park et al., 2004; Walseng et al., 2008)... EHD1, qui interagit avec la protéine Rab11-FIP2, est localisée au niveau des endosomes périphériques ; elle a des fonctions proches de celles de Rab35, ce qui suggère qu'EHD1 contrôle le transport des endosomes précoces, vers le compartiment de recyclage. Une étude a montré qu'EHD1 est associée à des moteurs moléculaires (dynéines) qui régulent le transport des endosomes de tri vers les endosomes de recyclage par l'intermédiaire d'un complexe incluant MICAL-L1 et Crmp2 (collapsin response mediator protein-2) (Allaire et al., 2010; Naslavsky et al., 2006; Rahajeng et al., 2010b). D'autres études montrent la très grande probabilité d'hétéro-oligomérisation des protéines EHDs. Seule la protéine EHD2 est capable de former des homo-oligomères (Daumke et al., 2007; Galperin et al., 2002; Lee et al., 2005). La fonction précise d'EHD2 n'est pas encore connue. Elle interagit avec la protéine EHBP1 (EH domain binding protein 1). EHBP1 et EHD2 sont toutes deux liées à l'internalisation du TfR et de GLUT4, probablement en reliant la machinerie d'endocytose aux filaments d'actine (via le domaine CH de EHBP1). Dans d'autres types cellulaires, EHD2 semble avoir une fonction redondante de celle d'EHD1. Ses fonctions mériteraient d'être précisées (Doherty et al., 2008; George et al., 2007; Guilherme et al., 2004a). EHD2, tout comme EHD1 est exprimée dans de nombreux tissus, EHD3 étant pour sa part plus fortement exprimée dans le cerveau, le foie et les reins et les myocytes de souris (Blume et al., 2007; Gudmundsson et al., 2010). Malgré une faible expression dans les cellules HeLa, l'extinction d'EHD3 entraîne une accumulation de récepteurs dans les endosomes de tri périphériques, qui n'arrivent pas à atteindre le compartiment de recyclage (Naslavsky et al., 2009; Naslavsky et al., 2006). EHD3 a aussi été impliquée dans le transport rétrograde des endosomes précoces vers le Golgi. Elle a été associée à l'altération morphologique du Golgi et un défaut de transport d'enzymes lysosomales. D'un autre côté, EHD3 présente une très forte homologie de séquence avec EHD1, ce qui laisse supposer une redondance dans les fonctions des deux protéines. En effet, il semble qu'EHD3 coopère avec EHD1 et Rab8 pour interagir avec la myosine Vb (Roland et al., 2007). En effet, l'expression de Rab8 et d'un fragment de la myosine Vb induit la délocalisation d'EHD 1 et 3 au niveau d'un compartiment de recyclage où est retrouvé le CMH-I. Un des moyens d'étudier les fonctions d'EHD1 et EHD3 serait d'éteindre l'expression de l'une ou l'autre, dans les cellules, et d'en examiner les conséquences sur le trafic vers la membrane plasmique. Enfin, EHD4 est localisée

au niveau d'un groupe d'endosomes précoces et est impliquée dans la régulation du transport de récepteurs vers le compartiment de recyclage, mais aussi vers les lysosomes. L'extinction de la protéine EHD4 entraîne la formation d'endosomes précoces géants, signature d'une activité de Rab5 trop importante. EHD4 peut former des hétéro-oligomères avec EHD1, mais des études sur des lignées cellulaires suggèrent qu'EHD4 intervient en amont d'EHD1. Dans les neurones, EHD4 est impliquée dans l'internalisation des récepteurs TrkA et TrkB, mais aussi dans le contrôle de l'endocytose de NgCAM quand elle est associée à EHD1 (George et al., 2007; Shao et al., 2002; Sharma et al., 2008; Valdez et al., 2005; Yap et al., 2010). L'ensemble de ces données montrent que les protéines EHDs, sont exprimées dans différents tissus, à des niveaux différents et peuvent, pour certaines, former des homo ou hétéro-oligomères (Figure 61). De plus chacune peut s'associer avec des partenaires différents leur permettant de réguler de nombreuses étapes du trafic membranaire.

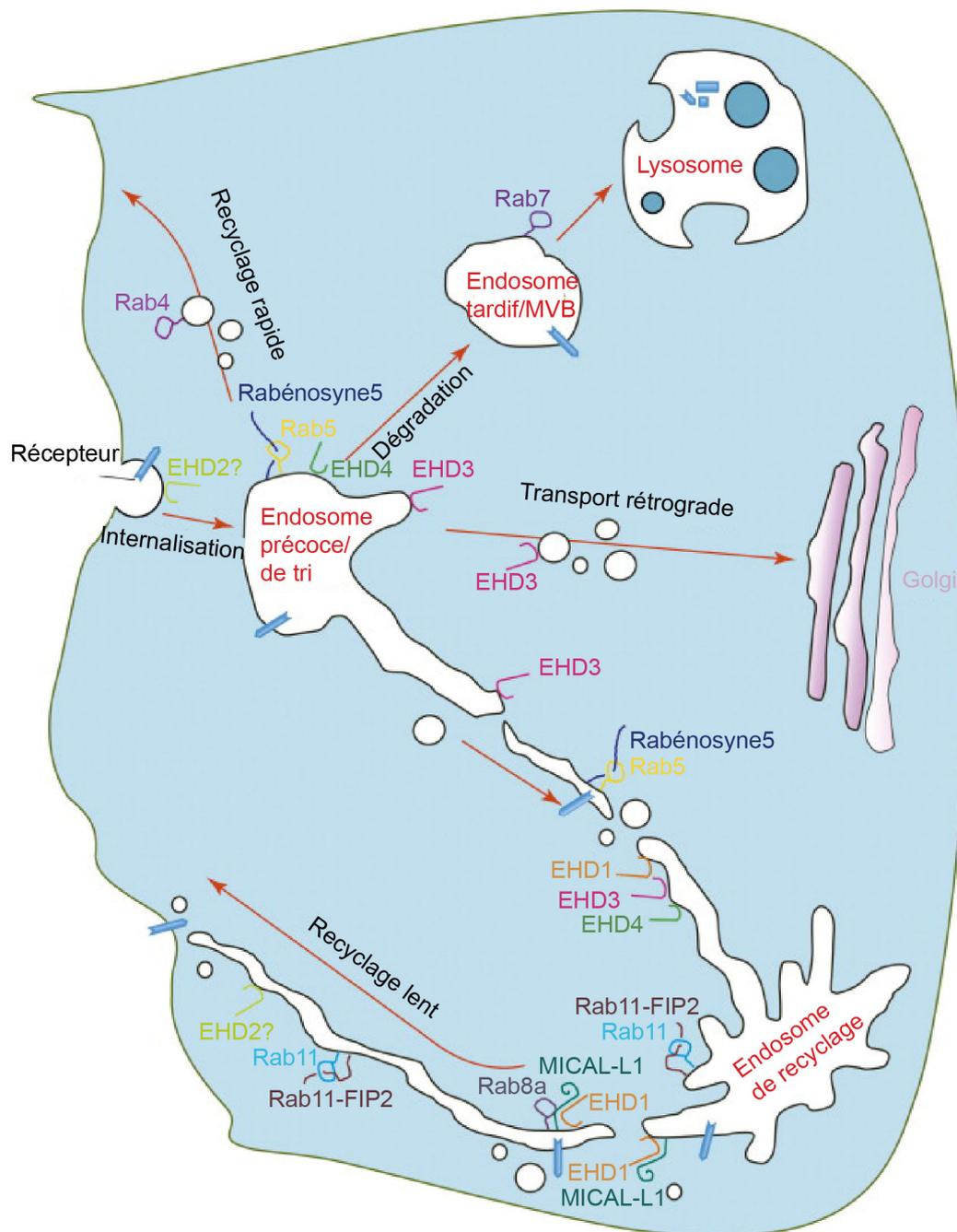


Figure 61 : Fonctions des protéines EHDs dans le transport intracellulaire.

Les récepteurs internalisés atteignent les endosomes précoces et sont triés vers au moins 4 voies différentes. Les récepteurs destinés à la dégradation sont compris dans des microdomaines contenant EHD4, Rab5 et Rabénosyne-5 et transportés vers les endosomes tardifs puis les lysosomes. D'autres protéines, comme la toxine Shiga, sont transportées vers le Golgi via le transport rétrograde, faisant intervenir EHD1 et/ou EHD3. Les protéines recyclées à la membrane plasmique peuvent l'être directement depuis les endosomes précoces (recyclage rapide, dépendant de Rab4) mais beaucoup de récepteurs transitent vers le compartiment de recyclage périnucléaire (recyclage lent). Ce recyclage lent présente plusieurs régulateurs dont Rab5, Rab11, Rab8a, Rab13 et Rab35, ainsi que leurs effecteurs qui sont respectivement Rabénosyne-5, Rab11-FIP2 et MICAL-L1 et les protéines EHDs. Adapté de (Naslavsky and Caplan, 2011).

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Nous avons constaté que le système de régulation du transport intracellulaire est composé de différents acteurs, plus ou moins bien caractérisés.

Ces dernières années, les protéines de la famille MICAL-L ont fait l'objet de plusieurs études. Ces protéines sont en effet capables de former des complexes avec de nombreux partenaires comme les Rabs, PACSINEs et EHDs.

Au laboratoire, nous avons identifié par un crible double-hybride, 2 protéines, PACSINE3 et EHD3, qui interagissent avec MICAL-L1. C'est pourquoi, durant mes travaux de thèse, j'ai étudié le rôle des interactions entre MICAL-L1 et PACSINE3 ou EHD3 dans le trafic membranaire.

Ces travaux ont pour but de mettre en évidence de nouveaux mécanismes et partenaires protéiques impliqués dans le recyclage de récepteurs à la membrane plasmique.

RESULTATS

RESULTATS

1) Résumé des principaux résultats soumis à publication

Dans cette partie sont résumés les principaux résultats soumis à publication de mon projet de thèse, portant sur l'implication de MICAL-L1 et de son partenaire PACSINE3 dans le recyclage membranaire du récepteur de la transferrine.

a) Interaction de MICAL-L1 et PACSINE3

Afin de vérifier de précédents résultats de double hybride, j'ai confirmé dans un premier temps l'interaction de MICAL-L1 et PACSINE3 par co-immunoprécipitation.

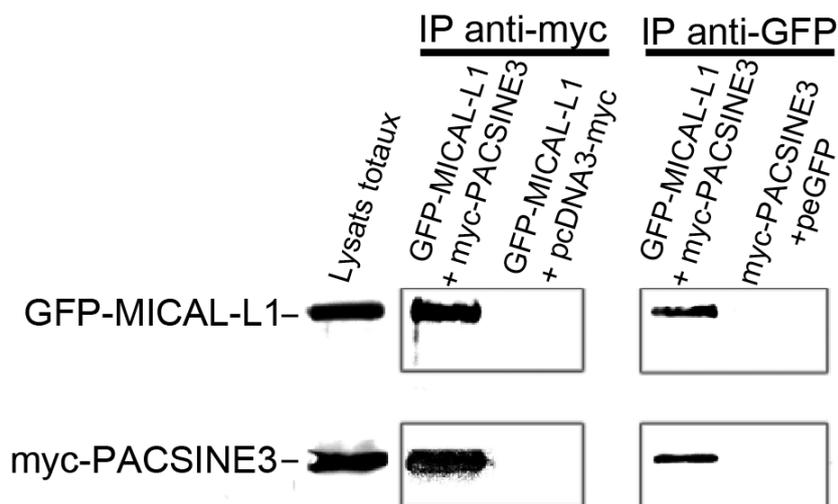


Figure 62 : MICAL-L1 et PACSINE3 interagissent dans la cellule.

Des lysats de cellules HeLa, coexprimant de façon transitoire GFP-MICAL-L1 et myc-PACSINE3, ou GFP-MICAL et myc, ou GFP et myc-PACSINE3, sont préparés. Les lysats sont immunoprécipités soit avec un anti-GFP, soit avec un anti-myc. Le matériel précipité est analysé par immunoblot avec les anticorps anti-GFP ou anti-myc.

Lorsque la protéine GFP-MICAL-L1 est précipitée, myc-PACSINE3 co-immunoprécipite. De même, lors de la précipitation de myc-PACSINE3, GFP-MICAL-L1 co-immunoprécipite. Ces résultats nous permettent de mettre en évidence l'interaction de GFP-MICAL-L1 et myc-PACSINE3.

Dans un deuxième temps, j'ai cherché à identifier les domaines de MICAL-L1 et PACSINE3 impliqués dans l'interaction de ces 2 protéines. J'ai donc généré

différentes constructions de la protéine de fusion GFP-MICAL-L1 et produit le domaine SH3 de la PACSINE3, fusionné à la GST, afin de réaliser un GST « pull-down ».

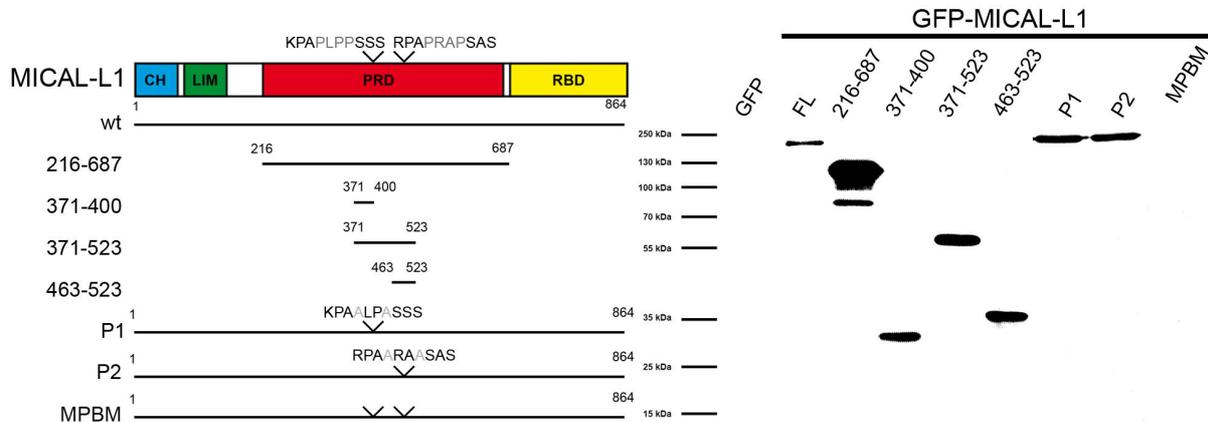


Figure 63 : Deux motifs PxxP de MICAL-L1 sont nécessaires et suffisants pour l'interaction avec le domaine SH3 de la PACSINE3.

Sur le panneau de gauche sont présentées les différentes constructions de MICAL-L1 qui ont été réalisées, ainsi que l'organisation générale de la protéine MICAL-L1 (CH : calponin homology, LIM : Lin-11, Isl-1, Mec-3, PRD : proline rich domain, RBD : Rab binding domain). Sur le panneau de droite, des lysats de cellules HeLa exprimant de façon transitoire ces différentes constructions ont été incubés en présence de GST-PACSINE3-SH3. Le matériel fixé est révélé par immunoblot avec un anticorps anti-GFP. Les lysats totaux, ainsi que le contrôle effectué avec la GST seule, sont présents dans l'article soumis à publication (Figure 1C et S1).

Ces expériences ont mis en évidence l'importance de 2 motifs PXXP (PLPP, appelé P1 et PRAP, appelé P2) dans l'interaction avec la PACSINE3. En effet, exprimés de façon individuelle, les mutants P1 ou P2 interagissent avec le domaine SH3 de la PACSINE3. Toutefois, la mutation des prolines des 2 motifs en alanines dans la protéine MICAL-L1 sauvage entraîne une perte de cette interaction, révélant que les 2 motifs sont nécessaires pour la formation du complexe MICAL-L1/PACSINE3. Ces 2 motifs sont aussi impliqués dans l'interaction des protéines MICAL-L1 et PACSINE2 (Giridharan et al., 2013).

b) MICAL-L1 et PACSINE3 colocalisent dans des compartiments de recyclage

Après m'être intéressé à l'interaction de MICAL-L1 et PACSINE3, j'ai déterminé la localisation de ces 2 protéines dans la cellule. Les cellules HeLa ont été transfectées

avec les protéines de fusion GFP-MICAL-L1 et mCherry-PACSINE3. Les 2 partenaires présentent une colocalisation quasi-parfaite (coefficient de Pearson = $0,9 \pm 0,05$), au niveau de structures vésiculo-tubulaires.

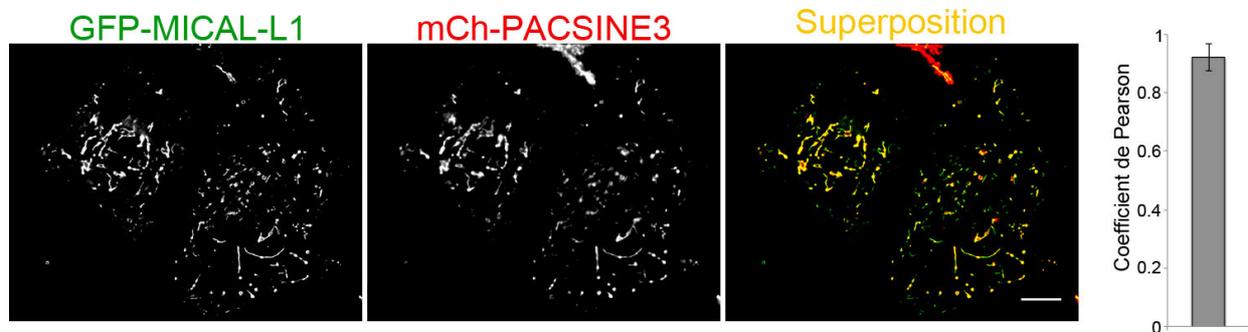


Figure 64 : MICAL-L1 et PACSINE3 colocalisent dans des structures vésiculo-tubulaires.

Des cellules HeLa, coexprimant de façon transitoire GFP-MICAL-L1 (vert) et mCherry-PACSINE3 (rouge), ont été fixées et analysées par microscopie à champs large. Une pile d'images en trois dimensions est acquise et déconvoluée. Les projections de chaque canal sont combinées en une seule image, présentée dans la troisième colonne (superposition). La colocalisation des deux protéines est révélée par la couleur jaune. Barre d'échelle 10 μm. La colocalisation des deux protéines a été quantifiée à l'aide du coefficient de Pearson (n=50 cellules).

Afin d'identifier les compartiments intracellulaires auxquels MICAL-L1 et PACSINE3 sont associées, les cellules transfectées ont été marquées avec un anti-EEA1 (endosomes précoces), un anti-TfR (endosomes précoces et de recyclage) ou un anti-Lamp1 (endosomes tardifs et lysosomes). Les structures positives pour GFP-MICAL-L1 et mCherry-PACSINE3 colocalisent faiblement avec EEA1 et Lamp1, mais présentent, en revanche, une association relativement forte avec les compartiments contenant le TfR (coefficient de Pearson = $0,59 \pm 0,10$). Ces résultats démontrent que MICAL-L1 et PACSINE3 sont associées à des endosomes de recyclage. Nous avons donc ensuite étudié le rôle de PACSINE3 et MICAL-L1 dans le recyclage du TfR.

c) MICAL-L1 et PACSINE3 s'associent avec l'acide phosphatidique.

Afin de comprendre comment les tubules membranaires de MICAL-L1 sont générés, nous avons examiné le type de lipide avec lequel MICAL-L1 et PACSINE3 s'associent. Pour cela, plusieurs tests d'association aux lipides ont été réalisés. De ces expériences, nous avons conclu que MICAL-L1 et PACSINE3 ne s'associent pas aux phosphoinositides. En revanche, les deux protéines ont la capacité de lier l'acide

phosphatidique, et il semblerait également que MICAL-L1 puisse lier la phosphatidylsérine, avec une spécificité moindre.

L'acide phosphatidique et la phosphatidylsérine, sont 2 lipides dont l'implication dans certains phénomènes de recyclage a déjà été vérifiée. Nous reviendrons sur ces exemples *infra* dans la discussion.

d) MICAL-L1 et PACSINE3 stimulent le recyclage du TfR

Dans le but d'étudier le processus de recyclage, nous avons utilisé une approche de détection d'évènements d'exocytose par microscopie à onde évanescente. Nous avons suivi le recyclage à la membrane plasmique du récepteur de la transferrine, fusionné à un fluorochrome sensible au pH, dérivant de la GFP, appelé pHluorine. Au pH des endosomes (environ 5,5) la molécule n'est pas fluorescente. En revanche à pH neutre, et lors de la fusion des vésicules de recyclage avec la membrane plasmique, la protéine devient fluorescente. Les cellules sont cotransfectées avec le TfR-pHluorine et avec différents ADNcs codant la mCherry seule, mCherry-MICAL-L1, mCherry-PACSINE3, mCherry-MICAL-L1MPBM et mCherry-MICAL-L1ΔRBD).

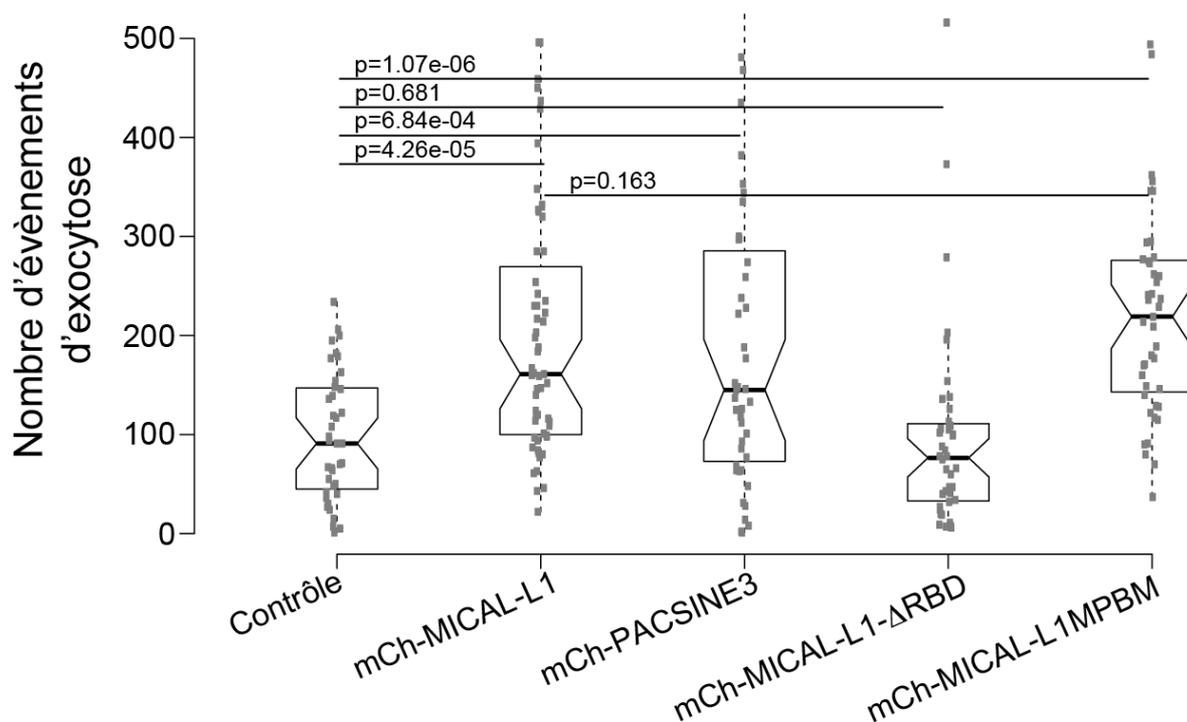


Figure 65 : MICAL-L1 et PACSINE3 stimulent le recyclage du TfR.

Quantification des évènements d'exocytose du TfR-pHI par TIRFM dans des cellules exprimant transitoirement soit la mCherry seule ($n=39$ cellules), soit mCherry-MICAL-L1 ($n=58$ cellules), soit mCherry-PACSINE3 ($n=40$ cellules), soit mCherry-MICAL-L1ΔRBD

(n=32 cellules), soit mCherry-MICAL-L1MPBM (n=43 cellules). Les valeurs p, indiquées pour chaque condition, sont comparées au contrôle ou à mCherry-MICAL-L1.

Les évènements d'exocytose sont détectés à l'aide d'un algorithme adapté de (Boulangier et al., 2010a). Chaque point correspond au nombre d'évènements d'exocytose du TfR-pHluorine. Les cellules surexprimant mCherry-MICAL-L1 présentent une augmentation significative des évènements d'exocytose, comparées aux cellules contrôles, montrant le rôle de MICAL-L1 dans le phénomène de recyclage du TfR. Il en est de même avec les cellules qui surexpriment mCherry-PACSINE3, mais avec un degré d'implication significativement moins important. En invalidant l'interaction de PACSINE3 avec MICAL-L1, grâce la construction MICAL-L1MPBM, le recyclage du TfR reste significativement élevé, suggérant que la PACSINE3 atténue l'effet de MICAL-L1 sur le recyclage. Cependant, on ne peut exclure que l'expression du mutant MICAL-L1MPBM favorise l'interaction avec d'autres partenaires, pour stimuler le recyclage du récepteur de la transferrine. Enfin, la surexpression de MICAL-L1 Δ RBD (incapable de s'associer aux Rabs et aux endomembranes) inhibe l'exocytose du TfR-pHluorine. Le nombre d'évènements d'exocytose est significativement moins élevé, comparé aux cellules contrôles. Ceci souligne également l'importance des protéines Rabs dans le processus de recyclage.

e) Les extinctions des protéines MICAL-L1 et PACSINE3 inhibent le recyclage

Le même protocole a été réalisé sur des cellules HeLa dont le niveau des protéines MICAL-L1 ou PACSINE3 a été réduit par ARN interférence, respectivement d'environ 80% et 60%.

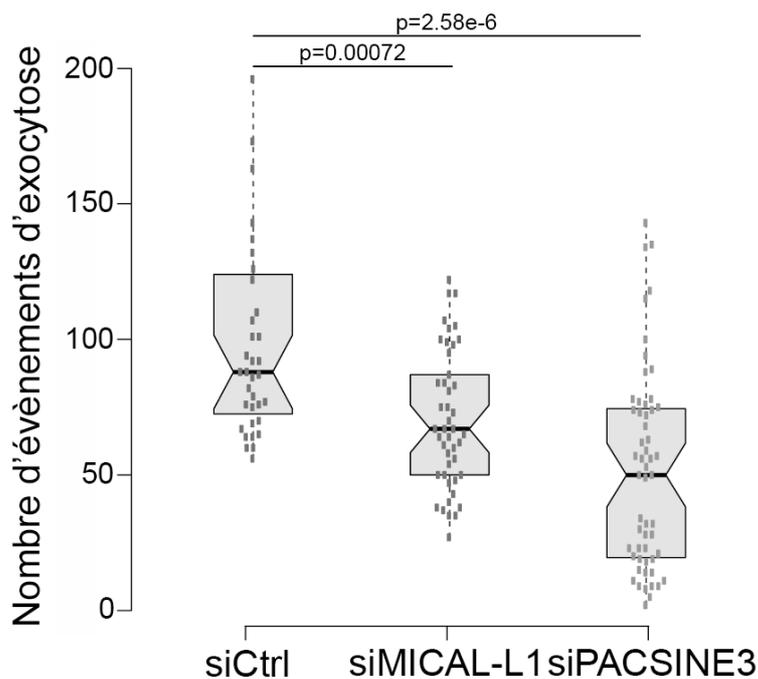


Figure 66 : L'extinction de MICAL-L1 ou PACSINE3 inhibe le recyclage du TfR.

Quantification des évènements d'exocytose du TfR-pHI par TIRFM dans des cellules dont l'expression de MICAL-L1 (n=45 cellules) ou PACSINE3 (n=55 cellules) a été réduite à l'aide de 2 séquences spécifiques d'ARN interférence, ou dans des cellules transfectées avec un ARN interférent ciblant la GFP (n=36 cellules) comme contrôle. Les valeurs p, indiquées pour chaque condition, sont comparées au contrôle.

L'extinction de l'expression des protéines MICAL-L1 ou PACSINE3 inhibe le recyclage du TfR-pHluorine ; l'effet de l'extinction de la PACSINE3 est plus prononcé. Ces résultats confirment l'implication des 2 protéines dans le recyclage du récepteur de la transferrine.

f) La PACSINE3 stimule la formation des tubules contenant MICAL-L1

Les phénomènes de tubulation et fission des membranes sont des phénomènes importants pour le tri et l'adressage des cargos au cours de l'endocytose. C'est pourquoi nous avons développé, en collaboration avec la plateforme d'imagerie (Institut Curie), un programme permettant de détecter les tubules, afin de les dénombrer et de les mesurer. La cotransfection de GFP-MICAL-L1 et mCherry-PACSINE3 augmente le nombre de tubules contenant MICAL-L1 et PACSINE3, en comparaison avec la surexpression de GFP-MICAL-L1 seule.

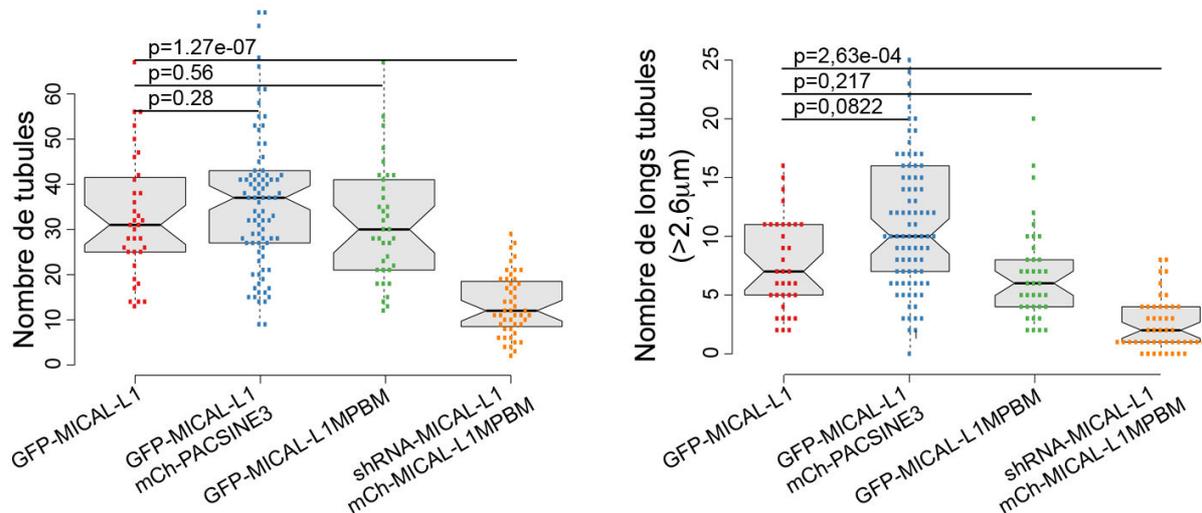


Figure 67 : PACSINE3 augmente le nombre et la taille des tubules formés par MICAL-L1.

Quantification du nombre de tubules et du nombre de tubules dont la longueur est $>2,6 \mu\text{m}$ dans des cellules surexprimant de façon transitoire GFP-MICAL-L1 sauvage, ou GFP-MICAL-L1 et mCherry-PACSINE3, ou GFP-MICAL-L1MPBM, ou dans des lignées cellulaires exprimant de façon stable un court ARN en épingle à cheveux spécifique de la séquence de MICAL-L1 et réexprimant une forme résistante de mCherry-MICAL-L1MPBM (2 séquences différentes ont été testées) ($n=30$ cellules par condition). Les valeurs p , indiquées pour chaque condition, sont comparées à la condition GFP-MICAL-L1.

PACSINE3 permet donc d'accroître le nombre et la longueur des tubules contenant MICAL-L1, suggérant que la PACSINE3 coopère avec MICAL-L1 dans la formation et l'élongation des tubules. Enfin, la réexpression du mutant MPBM dans des cellules HeLa exprimant de façon stable un shRNA inhibant la production de MICAL-L1, diminue de façon très significative le nombre et la longueur des tubules formés par MICAL-L1.

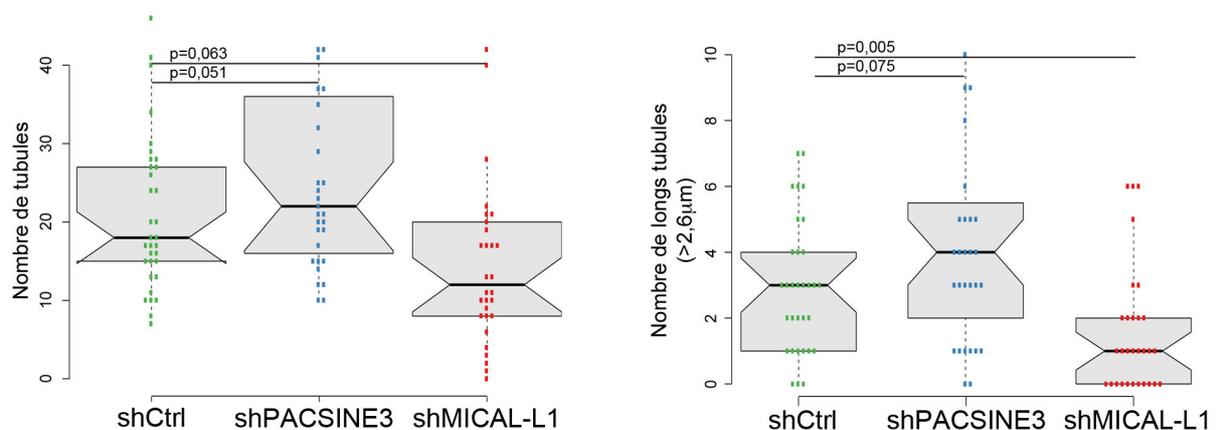


Figure 68 : L'extinction de PACSINE3 n'affecte pas les tubules formés par MICAL-L1.

Quantification du nombre de tubules et du nombre de tubules $>2,6 \mu\text{m}$ dans des lignées cellulaires exprimant de façon stable de courts ARN en épingle à cheveu ciblant spécifiquement les séquences de MICAL-L1 ou PACSINE3 ou exprimant de façon stable un court ARN en épingle à cheveu contrôle (n=20 cellules). Les valeurs p, indiquées pour chaque condition sont comparées au contrôle.

En revanche, l'utilisation d'ARN interférence ciblant la PACSINE3 n'affecte significativement ni la longueur, ni le nombre de tubules positifs pour MICAL-L1. Cette absence d'effet sur la formation de tubules pourrait s'expliquer par une compensation de la PACSINE3 par la PACSINE2.

La PACSINE3 est donc nécessaire à la bonne formation des tubules contenant MICAL-L1 (et très certainement la PACSINE2 qui doit avoir certaines fonctions redondantes avec la PACSINE3).

La PACSINE3, surexprimée seule, présente une distribution au niveau d'endomembranes et en dessous de la membrane plasmique. Sa coexpression avec MICAL-L1, la relocalise totalement au niveau des structures vésiculo-tubulaires contenant MICAL-L1. Enfin, la coexpression de GFP-PACSINE3 et de mCherry-MICAL-L1- Δ RBD, un mutant de MICAL-L1 incapable d'interagir avec les Rabs ou de s'associer avec les membranes, relocalise totalement la PACSINE3 dans le cytoplasme. Cette localisation cytoplasmique est celle que présente mCherry-MICAL-L1 Δ RBD lorsqu'elle est exprimée seule.

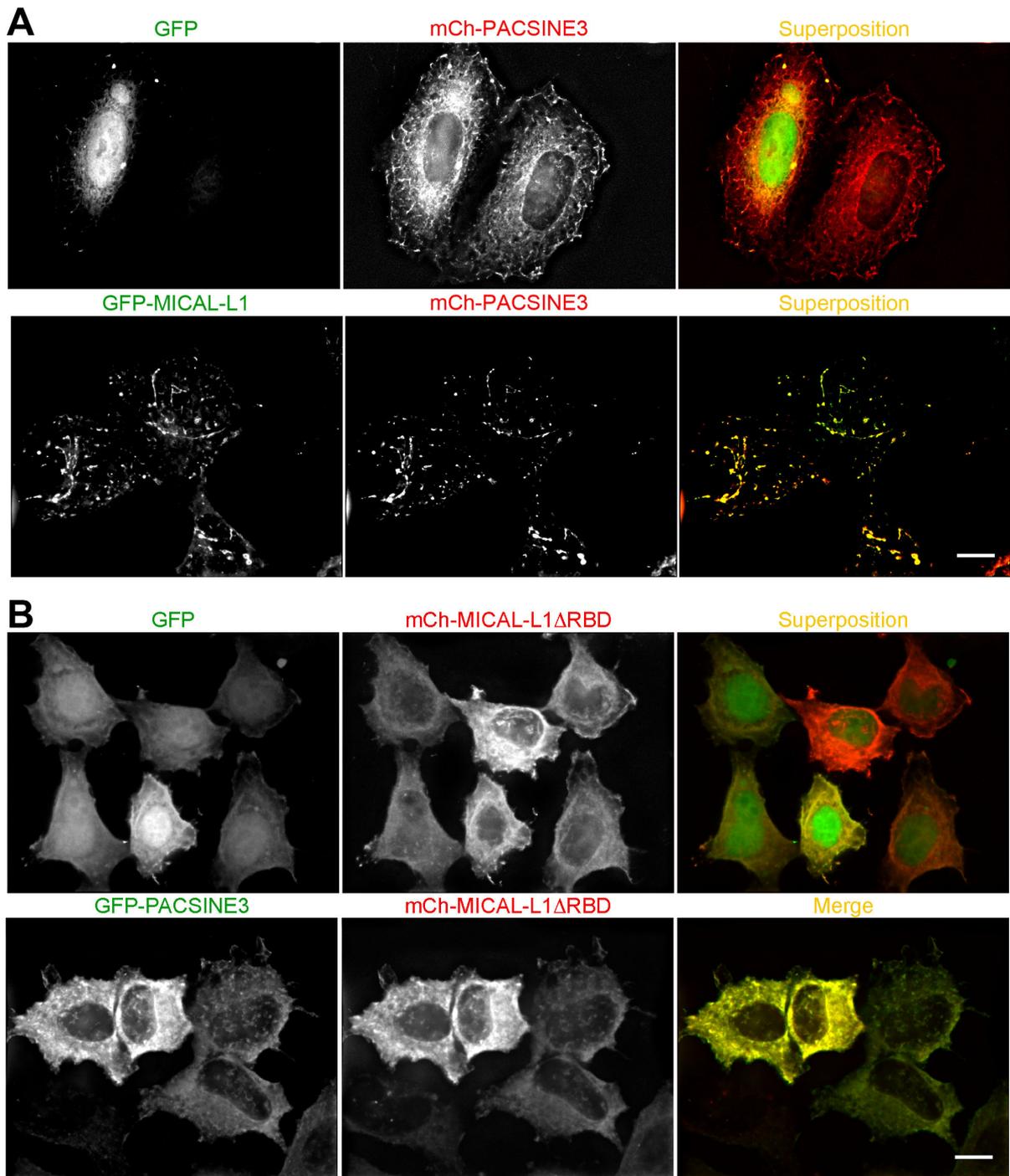


Figure 69 : MICAL-L1 délocalise la PACSINE3.

Des cellules HeLa ont été cotransfectées avec (A) la GFP seule et mCherry-PACSINE3, ou avec GFP-MICAL-L1 et mCherry-PACSINE3, ou (B) la GFP seule et mCherry-MICAL-L1 Δ RBD, ou GFP-PACSINE3 et mCherry-MICAL-L1 Δ RBD. Les cellules ont été fixées, immunomarquées et analysées par microscopie à champ large. Une pile d'images en trois dimensions est acquise et déconvoluée. Les projections de chaque canal sont combinées en une seule image, présentée dans la troisième colonne (superposition). La colocalisation des deux protéines est révélée par la couleur jaune. Barre d'échelle 10 μ m.

Tous ces résultats montrent que MICAL-L1 est essentielle pour la localisation de la PACSINE3, au niveau des endosomes tubulaires de recyclage, et que le recrutement de la PACSINE3 contribue à la génération et à l'élongation des structures tubulaires.

2) Article soumis à publication

Dans cette partie figure l'article qui va être soumis à publication au journal : The Journal of Cell Biology.

MICAL-L1/PACSIN3 complex mediates Transferrin receptor recycling to the plasma
membrane

Sikora R^{1,2,3}, Boulanger J⁴, Alqabandi M^{6,7,8}, Sengmanivong L^{4,5}, Salamero J^{4,5},

Niedergang F^{1,2,3}, and A. Zahraoui^{1,2,3}

1. Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France.
2. CNRS, UMR 8104, Paris, France.
3. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.
4. UMR144 CNRS, UPMC, Institut Curie, Paris, France
5. PICT-IBISA, Cell and Tissue Imaging Center Institut Curie, 75005 Paris, France
6. Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France
7. CNRS, PhysicoChimie Curie, UMR 168, Paris, France
8. Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Corresponding author, Dr. Ahmed ZAHRAOUI, Institut Cochin, Biology of Phagocytes
group, Infection, Immunity and Inflammation Department

22, rue Méchain, 75014 Paris, France.

Tél: 00 33 1 40 51 64 21, Fax: 00 33 1 40 51 64 30

Email: ahmed.zahraoui@inserm.fr

Running title: MICAL-L1/PACSIN3 interaction

Key words: membrane recycling, endocytosis, protein-protein interaction, Rab
effectors

Abstract

The recycling of receptors and lipids is tightly regulated and is essential for plasma membrane homeostasis, adhesion and cell migration. It requires small GTPase Rab proteins and their effectors. The MICAL-L1 protein, an effector of several Rabs is important for the recycling. Here, we report a novel interaction between MICAL-L1 and the BAR domain containing protein PACSIN3/Syndapin3 that contributes to the generation of tubular recycling endosomes. Our results implicate PACSIN3 in the recycling. MICAL-L1 is required for the localization of PACSIN3 to tubular endosome membranes. Importantly, disruption of the MICAL-L1/PACSIN3 interaction affects the transferrin receptor delivery back to the plasma membrane. MICAL-L1 and PACSIN3 bind phosphatidic acid and the MICAL-L1/PACSIN3 complex accumulates in elongated tubules that contain transferrin carriers. The dynamic of transferrin positive endosomes segregation from MICAL-L1/PACSIN3 tubules suggests that the MICAL-L1/PACSIN3 complex is rather involved in cargo sorting to the plasma membrane. Our data provides novel mechanistic insights on the dynamical regulation of the plasma membrane recycling pathway.

Introduction

Endocytosis and recycling are tightly regulated processes important for plasma membrane (PM) homeostasis, adhesion, cell migration, cytokinesis, cell polarity, phagocytosis and signal transduction. Proteins and lipids at the plasma membrane are either internalized via clathrin-coated vesicles (Doherty and McMahon, 2009), or by other clathrin independent mechanisms (Bantel-Schaal et al., 2009; Naslavsky et al., 2004; Nichols and Lippincott-Schwartz, 2001; Nonnenmacher and Weber, 2011). In both cases, the internalized vesicles deliver their cargo to early endosomes which are a major “station” where internalized cargoes are sorted and targeted either to late endosomes and lysosomes for degradation, recycled back to the plasma membrane through the recycling endosomes, or routed to the Trans Golgi Network (Grant and Donaldson, 2009). Endocytic recycling pathways are controlled by a large number of regulatory proteins, including the small GTPase Rab proteins, Rab4, Rab10, Rab11, Rab8, Rab13 and Rab35 (Babbey et al., 2006; Grant and Donaldson, 2009; Kouranti et al., 2006; Linder et al., 2007; Marzesco et al., 2002; Terai et al., 2006; Ullrich et al., 1996; van der Sluijs et al., 1992). Different Rab effectors play key roles in coordinating endosome trafficking and recycling. The receptor mediated endocytosis1 (RME-1) family of Eps15 homology domain containing proteins, EHD1 to 4, which are scaffolding and membrane tubulating proteins regulate endocytic recycling (Grant and Caplan, 2008). Depletion of EHD1 affects the recycling of transferrin receptor, MHC class I, GLUT4 transporters and beta1 integrin (Caplan et al., 2002; Daumke et al., 2007; Guilherme et al., 2004; Jovic et al., 2007). Importantly, EHD3, a member of EHD proteins, binds to NPF motifs in two Rab effectors, Rabenosyn5, an effector of Rab5, and FIP, an effector of Rab11, suggesting a role for EHD3 as a linker between the RAB5-associated early endosome and the RAB11-associated recycling endosomes (Braun et al., 2005;

Gidon et al., 2012; Naslavsky et al., 2006; Shi et al., 2007). Rab11-FIP3 interacts with both Rab11 and ARF6 and is crucial for perinuclear positioning of the recycling endosomes (Hickson et al., 2003). Rab22A regulates vesicles transport between early endosomes and recycling compartments (Magadan et al., 2006; Weigert et al., 2004). Rab10, a small GTPase closely related to Rab 8 and 13, controls clathrin-dependent and clathrin-independent membrane traffic between early and recycling endosomes (Babbey et al., 2006). Rab 8 and 13 have been implicated in the recycling to the plasma membrane in fibroblasts and polarized epithelial cells (Kohler et al., 2004; Linder et al., 2007; Marzesco et al., 2002; Morimoto et al., 2005). More recently, the Rab effector MICAL-L1, a protein that interacts with several Rabs including Rab 8, 11, 13 and 35, has also been associated with the recycling regulation (Abou-Zeid et al., 2011; Giridharan et al., 2012; Sharma et al., 2009). MICAL-L1 / Rab35 interaction promotes the recruitment of Rab8, Rab13, and Rab36 to Arf6-positive recycling endosomes during neurite outgrowth (Kobayashi et al., 2014). MICAL-L1 interacts with EHD1 which functions in the fission of tubulovesicular structures destined to be returned back to the plasma membrane from the recycling endosomes (Sharma et al., 2009). Finally, MICAL-L1 also binds PACSIN2 (also known as Syndapin2), a F-BAR protein that induces membrane bending and curvature (Giridharan et al., 2013). PACSIN2 also partially colocalizes with caveolin1 at the plasma membrane and mediates membrane sculpting by caveolin-1 (Senju et al., 2011).

Although evidence indicates that MICAL-L1 associates with membrane tubular recycling endosomes, the biogenesis of these membrane tubules is still unclear. We and others have shown that MICAL-L1 expression induces the formation of tubules in different cell lines (Abou-Zeid et al., 2011; Rahajeng et al., 2012; Reinecke et al.,

2015). MICAL-L1 has a calponin homology (CH), LIM, proline rich regions and RBD domain which binds Rab proteins.

Using a two hybrid screen, we identified PACSIN3 as a MICAL-L1 partner. PACSIN3 differs from the other family members, PACSIN1 and PACSIN2, in having a short proline-rich domain and lacking asparagine-proline-phenylalanine (NPF) motifs required for the interaction with EHD proteins. MICAL-L1 interacts with *PACSIN3 in vitro* and *in vivo*. Our data indicates that MICAL-L1 and PACSIN3 are important for the generation of tubular recycling endosomal membranes. They also reveal that MICAL-L1/PACSIN3 interaction is a key regulator of transferrin receptor recycling to the plasma membrane.

Results

MICAL-L1 interacts with PACSIN3

To identify targets of MICAL-L1, we used the truncated form of MICAL-L1 lacking the C-terminal Rab Binding Domain (RBD) as a bait in a yeast two-hybrid screen. Several clones were isolated. Sequence analysis of these clones revealed that they were derived from the same gene and encoded PACSIN3/Syndapin3 protein (not shown).

To confirm the interaction between PACSIN3 and MICAL-L1, we performed coimmunoprecipitation assays using HeLa cells expressing GFP-MICAL-L1 and myc-PACSIN3. As shown in Figure 1A, the anti-mycPACSIN3 pulled down GFP-MICAL-L1 proteins from cells coexpressing both proteins, but not from cells that expressed myc alone and GFP-MICAL-L1. Inversely, the anti-GFP coimmunoprecipitated myc-PACSIN3 from cells expressing both proteins, but not from cells expressing GFP alone and myc-PACSIN3. This indicates that MICAL-L1 and PACSIN3 were isolated as a complex from HeLa cells.

MICAL-L1 contains a proline rich domain (PRD), whereas PACSIN3 contains a SH3 domain. Thus, a PRD-SH3 interaction could mediate the formation of the MICAL-L1-PACSIN3 complex. To test this hypothesis, we performed GST or GST-PACSIN3-SH3 domain pull down assays using HeLa cell lysates expressing different constructs of MICAL-L1 (Figure 1B-D). GST-PACSIN3-SH3 domain interacted with MICAL-L1 protein as well as with the PRD domain of MICAL-L1 containing several PXXP motifs (Figure 1D). However, no interaction was detected between GST-PACSIN3-SH3 and the CHL or RBD domains of MICAL-L1 or GST alone (Figure S1).

In a second approach, we identified the binding motifs for PACSIN3 in the MICAL-L1-PRD. As shown in Figure 1B, two PRD constructs of MICAL-L1 containing two

PACSIN3-binding regions, PLPP at amino acid position 385 and PRAP at residue 480, are required for the interaction with PACSIN3. To check whether one or both of these PXXP motifs are necessary for MICAL-L1 binding to PACSIN3, we generated 3 mutants of the MICAL-L1: P1, in which the PLPP was mutated to ALPA, P2: PRAP was mutated to ARAA motifs, and a double mutant called MICAL-L1/PACSIN3 binding motif (MPBM) that bears two point mutations in the first and second motif (PLPP-ALPA and PRAP-ARAA). GST-pull down assays revealed that the MICAL-L1P1 or MICAL-L1P2 mutants did not alter the binding of MICAL-L1 to PACSIN3 compared with MICAL-L1FL, whereas the double mutant, MPBM, almost completely abolished MICAL-L1 binding to PACSIN3 (Figure 1D). This result strongly suggest that PLPP and PRAP motifs in MICAL-L1 are required for the efficient MICAL-L1/PACSIN3 interaction. Together, these data provide evidence for a novel and specific interaction between MICAL-L1 and PACSIN3.

PACSIN3 colocalizes with MICAL-L1 in recycling endosomes

We examined the subcellular localizations of the mCherry-MICAL-L1 and GFP-PACSIN3 in HeLa cells with low/moderate level of expression. As shown in Figure 2A, a highly significant overlap between MICAL-L1 (green) and PACSIN3 (red)-positive tubulo-vesicular structures was observed (Pearson coefficient > 0.9; Figure 2B). Further analysis of the colocalization of the two proteins by high resolution structured illumination microscopy strengthened this tubulo-vesicular localization. Both proteins were found at the periphery of vesicular structures. In addition, MICAL-L1/PACSIN3 are associated with long connected tubules (Figure 2C). The colocalisation of the two proteins was also confirmed in live cells. Time-lapse confocal video microscopy showed that GFP-PACSIN3 and mCherry-MICAL-L1 were present within vesicles and tubules (video 1). The tubules exhibited linear,

bidirectional, saltatory motion. In the typical sequence from which thumbnails (Figure 2D) were extracted, 6 frames were collected by confocal spinning disk microscopy at 500 ms intervals over a total time period of 3 min. In the resulting 2D maximum intensity projection, tubules appeared to move rapidly in the cytoplasm although with frequent pauses. They often encountered other tubulovesicular structures. Immunofluorescence experiments indicated that the MICAL-L1/PACSIN3 tubulovesicular structures did not colocalize with EEA1, an early endosomal marker, and Lamp1, a late endosomes-lysosomes protein. In contrast, MICAL-L1/PACSIN3 exhibited significant colocalization with the transferrin receptor (early-recycling endosomes marker) (Figure 2E-F, Pearson coefficient = 0.59 ± 0.10). Together, these results reveal that GFP-PACSIN3 and mCherry-MICAL-L1 are mainly present in a dynamic tubulo vesicular network which corresponds to the recycling endosomal compartments.

PACSIN3 and MICAL-L1 bind phosphatidic acid

BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) domain-containing proteins bind lipid bilayers and participate in cellular membrane remodeling (Qualmann et al., 2011; Quan and Robinson, 2013). The F-BAR proteins generate low curvature tubules. In the PACSIN proteins, the F-BAR domain from PACSIN 1 and 2 induce both high and low curvature membrane tubules. In contrast, PACSIN 3 can only induce low curvature membranes (Bai et al., 2012). MICAL-L1 has recently been shown to bind phosphatidic acid (Giridharan et al., 2013), whereas little is known about the ability of PACSIN3 to bind lipids. The RBD of MICAL-L1 is required for the association of the protein with endosome tubules in HeLa cells and binds phosphatidic acid (PA) and Rab proteins (Abou-Zeid et al., 2011; Giridharan et al., 2013). To investigate the lipid binding, we purified the His-MICAL-L1 C-terminal region (His-MICAL-L1 C-ter)

encompassing the PACSIN3 binding and the RBD domains and GST-PACSIN3. We then performed liposome flotation assays. The purified tagged proteins were incubated with rhodamin-labeled liposomes that contain different lipids and subjected to a stepwise sucrose gradient. After ultracentrifugation, more than 80% of the liposomes were present in the top layer. Under these conditions, we observed that both GST-PACSIN3 and the His-MICAL-L1 C-ter domain were detected at the top fraction in PA-containing liposomes but not in liposomes lacking PA (figure 3A). This strongly suggests that PACSIN3 and MICAL-L1 bind PA.

To determine whether MICAL-L1 and PACSIN3 associated with PA in cells, we used a GFP-PASS (phosphatidic acid biosensor with superior sensitivity), a well characterized PA specific probe (Zhang et al., 2014). GFP-PASS probe and mCherry- MICAL-L1 or mCherry-PACSIN3 were transiently expressed in HeLa cells and their distributions were analyzed by immunofluorescence microscopy. Figure 3B shows that mCherry-MICAL-L1 and mCherry-PACSIN3 partially co-localized with PA probe on vesicular structures whereas a mutant incapable of PA binding (mRFP-PASS 4E) was cytosolic and showed no codistribution with MICAL-L1 or PACSIN3 (Figure S2A). Interestingly, when mCherry-MICAL-L1 and myc-PACSIN3 were coexpressed with GFP-PASS in HeLa cells, the three proteins colocalized in vesicles but also in long tubules (Figure 3B). All together, the data suggests that PACSIN3, MICAL-L1 or MICAL-L1/PACSIN3 complex are able to associate with phosphatidic acid.

Given that MICAL-L1 C-ter protein binds phosphatidic acids, and according to the *in vivo* observations, our lipid mixture was composed of DOPC/DOPE/DOPS/Egg PA/Egg Rhod PE (33/33/13/20/0.8). Without addition of the protein to the GUVs, no tubulation was observed. Upon addition of fluorescent MICAL-L1 C-ter, the vesicles

displayed a drastic morphological change marked by the formation of floppy membrane tubes growing outward from the GUVs. We observed tubes with varied lengths, some of them were even longer than the diameter of the corresponding GUVs. Furthermore, we observed protein clusters located between the tubes and the corresponding vesicles (Figure S2B and videos 2 and 3).

MICAL-L1/PACSIN3 complex regulates TfR recycling

The association of MICAL-L1/PACSIN3 complex with recycling compartments suggested that it functions from recycling endosomes to the PM. To test this possibility, we used total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) to investigate the recycling to the PM of pHluorin tagged transferrin receptor. The TfR was a fusion construct with a pH sensitive GFP variant pHluorin attached to the extracellular domain of transferrin receptor (TfR-pHI) and transiently expressed in HeLa cells (Gidon et al., 2012; Merrifield et al., 2005). We checked that mCherry-MICAL-L1 and TfR-pHI partially colocalized in tubulo-vesicular structures (Pearson coefficient = 0.6 ± 0.11 , Figure 4A-B). HeLa cells expressing TfR-pHI and either MICAL-L1, PACSIN3, PACSIN3-binding mutant of MICAL-L1 (MPBM) or MICAL-L1 Δ RBD (MICAL-L1 without RBD) were imaged using an illuminating evanescent field with an approximate depth constant of 100 nm. Upon recycling to the cell surface, the TfR-pHI fluorescence appears as bright and sudden spots by TIRFM (videos 4-6), which can be quantified. Cells expressing the mCherry-MICAL-L1 or mCherry-PACSIN3 showed a substantial increase in TfR-pHI recycling events compared to control cells (Figure 4C). Intriguingly, cells expressing MPBM mutant exhibited a high significant increase in the number of TfR recycling events compared with control cells (Figure 4C, p 0.00000107). Relative to control cells, the MPBM mutant displayed approximately two fold increase in TfR recycling spots, indicative of

a substantial stimulation of TfR recycling to the PM. In contrast, expression of mCherry-MICAL-L1 Δ RBD inhibited the recycling of TfR events to the PM compared with MICAL-L1 cells, indicating that the RBD domain of MICAL-L1 is important for the recycling of TfR carriers.

Interestingly, mapping exocytosis sites in single cells indicated that the sites for TfR-pHluorin recycling back to the plasma membrane mostly concentrated at the cell periphery in control cells as well as cells expressing MICAL-L1 or PACSIN3 (Figure 4D and videos 4-6). These data show that the expression of MICAL-L1 or PACSIN3 affect the overall recycling activity but does not impact the distribution of preferential sites of recycling where TfR-pH carriers fuse with the plasma membrane.

To visualize the recycling of transferrin (Tf) from MICAL-L1 /PACSIN3 tubules, HeLa cells were transiently transfected with GFP-MICAL-L1 and myc-PACSIN3 and pulsed-chased with Tf-AlexaFluor 555 to label recycling endosomes. We checked that all cells that expressed GFP-MICAL-L1 also expressed myc-PACSIN3 (not shown). Live cells were then imaged by spinning-disk confocal microscopy. Tf cargo localized in MICAL-L1/PACSIN3 tubules. Tubules length varied widely, but the majority of tubules were longer than 1-2 μ m. Tf labeled tubules were dynamic (videos 7-8, Figure 5). Tf fluorescent structures segregating and detaching from MICAL-L1/PACSIN3 tubules were often observed. Moreover, Tf labeled endosomes established and maintained contacts with MICAL-L1/PACSIN3 tubules. The dynamics of Tf endosomes segregation from tubules suggest that the MICAL-L1/PACSIN3 complex controls Tf recycling endosomes delivery to the plasma membrane.

Depletion of MICAL-L1 or PACSIN3 inhibits TfR recycling

To shed light on the function of MICAL-L1, we used siRNAs to reduce MICAL-L1 and PACSIN3 expression in HeLa cells. Two different siRNAs targeting human MICAL-L1, PACSIN3 mRNA sequences and a control sequence were transiently expressed in HeLa cells. Transfected siRNAs sequences induced depletion (more than 60 to 80 %) of MICAL-L1 and PACSIN3 proteins (Figure 6A-B). MICAL-L1-siRNA, PACSIN3-siRNA, and the control were used for subsequent studies. We first investigated whether depletion of MICAL-L1 and PACSIN3 affects the dynamics of TfR-pHI recycling using TIRFM. Knocking down MICAL-L1 or PACSIN3 significantly reduced the number of TfR-pHI recycling events. However, the effect of PACSIN3 depletion was higher than that of MICAL-L1 (Figure 6C). We have previously shown that knock down of MICAL-L1 promoted EGFR degradation in epithelial cells (Abou-Zeid et al., 2011). Ligand binding to EGFR at the cell surface leads to rapid internalization of EGF-EGFR complexes in early endosomes. Receptors can be targeted to lysosomes for degradation (Roxrud et al., 2008). We used vectors encoding short hairpin RNAs (shRNAs) to reduce MICAL-L1 and PACSIN3 expression in HeLa cells. The shRNA vector contains a GFP reporter gene that was used as a marker for transfected cells. Two different shRNAs targeting human MICAL-L1, PACSIN3 mRNA sequences and a control sequence were expressed in stably transfected HeLa cells. We selected two clones corresponding to two different shRNA sequences that showed strong depletion (more than 80 %) of MICAL-L1 and PACSIN3 proteins (Figure 7A). Those clones were chosen for subsequent studies. We assessed the biochemical EGFR degradation in HeLa cells expressing shRNAs control or targeting human MICAL-L1 or PACSIN3. Cells depleted of MICAL-L1 and PACSIN3 exhibited a substantial increased EGFR degradation (>25 %) compared with control cells (Figure S3).

The MICAL-L1/ PACSIN3 complex mediates tubulation of recycling endosomes

The interaction of MICAL-L1/PACSIN3 and their association with membrane tubules raised the question of whether MICAL-L1 and PACSIN3 act in concert for formation of endosome tubules in HeLa cells. Overexpression of mCherry-PACSIN3 in cells producing GFP-MICAL-L1 led to a 1.3-fold increase in tubule number and length of more than 2.6 μm (Figure 7B-E) compared with GFP-MICAL-L1 expressing cells, indicating that PACSIN3 weakly stimulates MICAL-L1 tubule formation and elongation. The expression of MICAL-L1MPBM mutant unable to interact with PACSIN3 did not significantly affect MICAL-L1 tubules number and length compared with MICAL-L1 expressing cells. However, the expression of a shRNA-resistant mCherry-MICAL-L1MPBM mutant in cells depleted of endogenous MICAL-L1 led to a dramatic reduction in the number and length of tubules of more than 2.6 μm , compared with MICAL-L1 expressing cells (figure 7C-E), strengthening the notion that the interaction of MICAL-L1 with PACSINs is important for tubules formation and elongation.

All together, these results indicate that the MICAL-L1/PACSIN3 complex controls the formation and elongation of MICAL-L1 membrane tubules.

Consistent with these observations, depletion of MICAL-L1 in HeLa cells induced a reduction in the number and length ($>2.6 \mu\text{m}$) of tubules compared to control cells. However, PACSIN3-shRNA depletion did not significantly affect MICAL-L1 tubule number or length ($>2.6\mu\text{m}$, Figure 8A-C) in comparison with mock cells, suggesting that the effect of PACSIN3 is compensated by other PACSINs such as PACSIN2 which also interacts with MICAL-L1 through the same PLPP and PRPP motifs (Giridharan et al., 2013).

To clarify the relationship between MICAL-L1 and PACSIN3, we examined the effect of PACSIN3 shRNA depletion on the localization of the MICAL-L1. PACSIN3 depletion did not affect MICAL-L1 localization; mCherry-MICAL-L1 still localized to tubulo-vesicular structures (Figure 8A). In cells expressing GFP as control, mCherry-PACSIN3 was mainly associated with a network of vesicles spread throughout the cytoplasm and at the cell periphery (we were not able to detect endogenous PACSIN3 because anti-PACSIN3 antibodies yielded a significant background). Interestingly, overexpression of GFP-MICAL-L1 induced mCherry-PACSIN3 redistribution and recruitment to tubulo-vesicular structures (Figure 8D). Furthermore, the expression of a truncated form of MICAL-L1, mCherry-MICAL-L1 Δ RBD, induced the mislocalization of PACSIN3 whose distribution is mainly diffuse in the cytoplasm similar to that of MICAL-L1 Δ RBD (figure 8E). All together, the data supports the notion that MICAL-L1 plays a crucial role in the localization of PACSIN3 to tubular endosomes and that PACSIN3 recruitment to membranes contributes to the generation of tubular structures.

Discussion

In this study, we describe a novel interaction between MICAL-L1 and the BAR domain containing protein PACSIN3/Syndapin3. The data reveals that the interaction is mediated by the SH3 domain of PACSIN3 and two PXXP motifs in the PRD of MICAL-L1. Previous studies showed that PACSIN2/Syndapin2 interaction with MICAL-L1, stabilized their association with membranes, allowing for nucleation of tubules by syndapin2 and highlighting a new role for phosphatidic acid in endocytic recycling (Giridharan et al., 2013). MICAL-L1 / PACSIN3 binds PA and the MICAL-L1/PACSIN3 complex colocalizes with PA in tubules in cells. While the role of PA in recycling endosomal tubule biogenesis remains ambiguous, it is possible that PA supports the generation of long, wide, and stable MICAL-L1/PACSIN containing tubules. It has been implicated in membrane fission and so might also promote the release of recycling carriers (Jovanovic et al., 2006). Although the MICAL-L1 C-ter domain does not encompass any obvious amphipathic helice sequences or display homology to BAR domains, we detected lipid tubular structures when this domain was incubated with GUVs.

Our finding that another protein of the Syndapin family, PACSIN3, is also a MICAL-L1 partner emphasizes an important function of MICAL-L1/PACSIN complexes in membrane bending and curvature and hence in the regulation of recycling to the plasma membrane. Interestingly, in addition to the function of PACSINs in inhibiting transferrin uptake (Modregger et al., 2000), our results implicate PACSIN3 in the recycling. Moreover, we show that the major site of action of the MICAL-L1/PACSIN3 complex is recycling endosomes. Indeed, both proteins are mainly colocalized in recycling endosomes, Furthermore, interference with the MICAL-L1/PACSIN3 interaction affects transferrin receptor recycling. Thus, this study reveals not only an

interaction between two components of the TfR trafficking machinery, MICAL-L1 and PACSIN3, but also the function of this complex in the recycling of the TfR from endosomes to the plasma membrane.

MICAL-L1/PACSIN3 complex functions at the recycling pathway

The observed effect of MICAL-L1 on TfR recycling is supported by the fact that this scaffolding protein is known to associate with several small GTPase Rab proteins that regulate the recycling pathway (Abou-Zeid et al., 2011; Kobayashi et al., 2014; Rahajeng et al., 2010; Rahajeng et al., 2012). The fact that MICAL-L1 binds Rab8a and Rab11, but not Rab4 (Abou-Zeid et al., 2011), suggests that it is implicated in the regulation of the slow recycling pathway.

To our knowledge, PACSIN3 has not been previously implicated in the recycling of internalized receptors from recycling endosome compartments. Our data shows for the first time a role for PACSIN3 in the TfR recycling process via its association with MICAL-L1. In addition, the specificity of this interaction at the recycling endosomes is supported by the fact that the inhibition of the MICAL-L1/PACSIN3 interaction stimulates TfR recycling to the plasma membrane. This suggests that PACSIN3 attenuates MICAL-L1's effect on the recycling. However, we cannot rule out the possibility that inhibiting the binding of MICAL-L1 to PACSINs favors the association with other proteins to stimulate TfR recycling. Indeed, MICAL-L1 associates with EHD1 to connect various proteins to recycling endosomes (Giridharan et al., 2012; Sharma et al., 2009). Alternatively, MICAL-L1/PACSIN3 recruitment on recycling membranes functions as a regulating switch or modulator for membrane recycling activity, allowing the cell to respond to physiological external cues, such as adhesion, migration or cell differentiation.

Consistent with our overexpression studies, depletion of MICAL-L1 or PACSIN3 inhibits the TfR recycling events at the plasma membrane. In MICAL-L1 knock down cells, there is a significant reduction of TfR recycling events. Intriguingly, knocking down MICAL-L1 or PACSIN3 also stimulates EGFR degradation. It is possible that depletion of MICAL-L1 or PACSIN3 impairs the recruitment of key endosomal recycling proteins, such as EHDs, Rab5 or other proteins leading by default to the degradative pathway. Taken together, our results highlight the notion that the MICAL-L1/PACSIN3 complex serves an essential function in TfR delivery to the plasma membrane. Moreover, our data extends the sites of PACSIN3 function to another intracellular compartment, the recycling endosomes.

The generation of membrane tubules and their subsequent fission to transport vesicles is required for sorting of cargo molecules. A striking observation is that MICAL-L1/PACSIN3 cooperates for membrane tubules formation. In cells knocked down for MICAL-L1, the numbers and length of membrane tubules of more than 2.6 μm is much lower than in control cells. Consistent with this finding, we noticed a clear effect of MICAL-L1MPBM mutant expression on the number and length of MICAL-L1 tubules in MICAL-L1 depleted cells. Confocal video spinning microscopy revealed that these tubules contained labeled Tf. The tubules in MICAL-L1/PACSIN3 expressing cells rarely fragmented over minutes. Video microscopy showed that Tf cargo segregated from those tubules suggesting that MICAL-L1/PACSIN3 are rather involved in cargo sorting to the plasma membrane.

Our results reveal for the first time that MICAL-L1 play a key role in PACSIN3 localization, since MICAL-L1 Δ RBD expression induces PACSIN3 redistribution to the cytosol. PACSIN3 depletion does not affect MICAL-L1 tubule number and length, suggesting that PACSIN3 function can be compensated by another PACSIN, such as

PACSIN2. Importantly, the expression of MICAL-L1MPBM, that is unable to interact with PACSIN3, does not significantly alter MICAL-L1 tubules number or length (compared with MICAL-L1 producing cells), suggesting that the effect of the mutant is counterbalanced by the endogenous MICAL-L1. Indeed, expression of a shRNA-resistant MICAL-L1MPBM mutant in cells depleted of MICAL-L1 reduces the total number and length of tubules $> 2.6 \mu\text{m}$. We propose that the MICAL-L1MPBM mutant is targeted to the RE through its RBD domain which is required for the correct localization of MICAL-L1. Furthermore, this mutant may interact with other MICAL-L1 partners, such as EHD1 which interacts with PACSIN2 (Giridharan et al., 2013), to fulfill its recycling function.

PACSINs are implicated in the regulation of endocytic events (Modregger et al., 2000). The ability of F-BAR domain proteins to induce tubular invaginations of membranes is enhanced by disruption of the actin cytoskeleton, suggesting a close interplay between the actin dynamics and those that mediate membrane invagination and fission (Itoh et al., 2005). RAB8, a partner of MICAL-L1, is also present on tubular endosomes where it might function with MICAL-L1 to promote recycling and cortical actin-driven plasma membrane protrusions (Hattula et al., 2006).

Taken together, our data strongly suggests that MICAL-L1 is essential for membrane tubule biogenesis and recruits PACSIN3 to the recycling endosomes where PACSIN3 may help in shaping membranes.

Our data provides strong evidence for a function of MICAL-L1 in tubule biogenesis process. Moreover, MICAL-L1 and PACSIN3 cooperate for the formation of membrane tubules. We speculate that MICAL-L1, by recruiting PACSINs to tubular endosomes, stabilizes those tubules and organize a PA membrane rich subdomain

which constitutes a platform for sorting/targeting carriers from recycling membranes to the cell surface.

Materials & Methods

Constructs

TfR-pHluorin was provided by Dr David Perrais (IINS, Bordeaux, FR), GFP-PASS and mRFP-PASS4E by Guangwei Du (university of Texas, USA). The myc-PACSIN3 was provided by Marcus Plomann (University of Köln, Germany). Cloning of MICAL-L1 into pEGFP-C1 and pmCherry-C1 vector was previously described (Abou-Zeid et al., 2011). The EcoRI-BamHI mouse PACSIN3 cDNA fragment was inserted into the corresponding sites of pEGFP-C2 and pmCherry-C2 vectors to generate GFP-PACSIN3 and mCherry-PACSIN3 proteins.

Lipids reagents

All the reagents and β -casein from bovine milk (>99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, France). DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine), DOPS (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), DOPE (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanol-amine), Egg PA (L- α -phosphatidic acid) and Egg Rhod PE (L- α -phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) were purchased from Avanti Polar Lipids, Inc (Avanti Polar Lipids, U.S.A.). Stock solutions of the lipids were in chloroform at a concentration of 10 mg/mL and were stored at -20°C in amber vials (Sigma-Aldrich, France). Lipid stock solutions were mixed to achieve the desired molar ratio of DOPC/DOPE/DOPS/Egg PA/Egg Rhod PE (33/33/13/20/0.8) at a total concentration of 1 mg/ml in chloroform. After use, argon was added to the vials before sealing them with paraffin film (Parafilm, USA) to prevent lipid oxidation.

Antibodies

The purified His-MICAL-L1 C-terminal protein (amino acids 520-863 of MICAL-L1) was injected into rabbits to generate polyclonal antibodies (Covalab. Villeurbanne, FR). The resulting antiserum was affinity purified against His-MICAL-L1 C-ter protein. Anti-EEA1 monoclonal antibody was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Anti-EGFR polyclonal antibody from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-GFP and anti-c-myc monoclonal antibodies from Roche (Basel, CH). Anti-Lamp1 monoclonal antibody from BD Pharmingen (San Diego, CA). Anti-PACSN3 polyclonal antibody from Abcam (Cambridge, UK), anti-transferrin receptor from Curie Institute (CNRS UMR144, recombinant antibodies facility, Paris, FR), and Donkey-affinity purified antibodies conjugated to Cy2, Cy3, or Cy5 were from Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA).

Cell culture and transfection

HeLa cells were grown in DMEM containing 10% fetal calf serum (FCS) (Gibco. Waltham, MA) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 10 mg/ml streptomycin. The cells were incubated at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. Stable HeLa cells expressing shRNA of MICAL-L1 and PACSN3 were generated. Positive clones were selected in the same medium supplemented with 0.3 µg/ml zeocin (Gibco. Waltham, MA). Stably transfected clones were maintained under selection in 0.1 µg/ml of zeocin. The shRNA sequences that efficiently inhibited proteins expression were as follow : MICAL-L1 shRNA oligo-sens, 5'-ACCTCGTGGAGCCTAGAGTGGAACAATC AAGAGTTGTTCCACTCTAGGCTCCACTT-3'; MICAL-L1 shRNA oligo-antisens , 5' – CAAAAAGTGGAGCCTAGAGTGGAACAACTCTTGATTGTTCCACTCTAGGCTCCA

CG-3' ; PACSIN3 shRNA oligo-sens , 5'-ACCTCGGCTTGTTCTAGCGTGTATTATCA AGAGTAATACACGCTAGAACAAAGCCTT-3'; PACSIN3 shRNA oligo-antisens , 5'-CAAAAAGGCTTGTTCTAGCGTGTATTACTCTTGATAATACACGCTAGAACAAAGCC G-3'. HeLa cells were transfected with Lipofectamine 3000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen).

siRNA duplexes for MICAL-L1 and PACSIN3 were designed using siRNA Wizard (InvivoGen) and were transfected using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen). The siRNA sequences that efficiently inhibited protein expression were as follows : MICAL-L1 siRNA oligo-sens 1, 5'-GTCCCAGTATTACAACCACTT-3' ; MICAL-L1 siRNA oligo-antisens 1, 5'-AAGTGGTTGTAATACTGGGAC-3' ; MICAL-L1 siRNA oligo-sens 2, 5'-GTGGAGCCTAGAGTGGAACAA-3' ; MICAL-L1 siRNA oligo-antisens 2, 5'-TTGTTCCACTCTAGGCTCCAC-3' ; PACSIN3 siRNA oligo-sens 1 , 5'-GGACAATCAGCCGGAAAGAGA-3' ; PACSIN3 siRNA oligo-antisens 1 , TAATACACGCTAGAACAAAGCC ; PACSIN3 siRNA oligo-sens 2 , 5'-GGCTTGTTCTAGCGTGTATTA-3' ; PACSIN3 siRNA oligo-antisens 2 , TCTCTTTCCGGCTGATTGTCC .

Immunoblot and coimmunoprecipitation

HeLa cells were lysed in the buffer, 20 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40 with a protease cocktail inhibitor (sigma Aidrich). Solubilized material was recovered by pelleting at 18.000 g for 15 min at 4°C and supernatants were collected. Protein amounts were determined using the Pierce BCA assay (Life Technologies) and equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred electrophoretically to polyvinylidene fluoride filters. Immunoblot was performed using anti-MICAL-L1, anti-PACSIN3 or anti-EGFR antibodies and

enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's protocol (Thermo Scientific, Rockford, IL). For immunoprecipitation, cells were plated, transfected with GFP-MICAL-L1 and myc-PACSIN3 cDNAs and extracted in IP buffer (100 mM Tris HCl pH7.7, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X100 with a protease cocktail inhibitor. After centrifugation, supernatants were incubated with anti-GFP or anti-myc for 4 hours. Protein G agarose beads (GE Healthcare) were added for 2 hours and the beads were washed 3 times with IP buffer. Bound material was solubilized with SDS-PAGE sample buffer and analyzed by immunoblotting with anti-GFP or anti-myc antibodies.

GST pull-down assay

The GST-SH3 fusion protein was generated by inserting a BamHI-EcoRI fragment containing the SH3 domain of PACSIN3 into the corresponding sites of pGEX2T expression vector. GST-fusion proteins were expressed in *E. coli* and purified according to the manufacturer's protocol (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). Purified GST or GST-PACSIN3 were bound to glutathione beads (GE Healthcare) and incubated 4 hours with cell extract from HeLa cells expressing GFP alone or different constructs of GFP-MICAL-L1. Beads were washed 3 times and bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and immunoblot using monoclonal anti-GFP antibody.

The cDNA encoding His-MICAL-L1 C-ter (amino acids 520-863) was inserted in pET15b expression vector using NdeI-XhoI restriction sites. The His-MICAL-L1-C-ter fusion protein was produced in *E. coli* and purified on Ni²⁺-beads according to the manufacturer's protocol (Novagen, Cambridge, MA).

Immunofluorescence staining

Cells on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature and permeabilized using 2% FCS and 0.05% saponin for 20 min at room temperature in PBS. Cells were then incubated with primary antibody in 2% FCS, 0.05% saponin in PBS for 1 hour at room temperature and then incubated with secondary conjugated antibody for 45 min at room temperature in the same buffer. Cells were washed 3 times with 2% FCS, 0.05% saponin in PBS. After washing in PBS, samples were mounted in fluoromount G (Interchim) and analyzed with a 3D microscope (see next section) and further processed with Image J software.

Fixed cell wide-field imaging

Images were acquired using either a Leica DMI 6000 inverted fluorescence microscope with a HCX PL APO 1.4NA 100x objective and a ORCA-Flash4.0 Digital CMOS camera (Hamamatsu) or a NiU Nikon camera CCD DS-Ri1, 1280 x 1024, cooling and color camera illumination: Intensilight, mercury-fiber illuminator 100x APO VC NA 1,4 oil Deconvolution (Sibarita, 2005). They were acquired using Metamorph software (Molecular Devices) with the following protocol, a Z stack of 25-35 plans (0.3 microns step) was acquired. Images were then generated by compiling three-dimensional maximum intensity projections of 20 plans using Image J software.

Live cell imaging setup

Confocal spinning videomicroscopy sequences were acquired on an Eclipse Ti inverted microscope with a CFI Plan Apo VC 1.4NA 100x objective and a piezo motorized (PI), for fast Z displacement, equipped with a temperature and CO₂ controller. GFP/pHluorin and mCherry were respectively excited with a 491 and

561nm laser. Fluorescent emissions were captured on a CoolSNAP HQ2 CCD camera (Roper Scientific). Image sequences were generated with the following protocol, a Z stack of five plans (0.3 microns) was acquired in stream mode, every 500 ms, illuminated 50 ms per plan, total duration of the acquisition was from 1 to 3 min. Movies were then generated by compiling three-dimensional maximum intensity projections.

For transferrin-AlexFluor555 time-lapse video, cells were starved for 30 min in the medium without FCS before the addition of labeled transferrin and subsequent acquisition. Acquired videos were denoised using NdSafir software (Boulanger et al., 2010b).

Structured Illumination Microscopy (SIM)

Acquisitions were performed in 3D SIM mode, with a N-SIM Nikon microscope before image reconstruction using the NISElements software (Gustafsson et al., 2008). The system is equipped with an APO TIRF 100x 1.49NA oil immersion, a laser illumination (488nm 200mW and 561nm 100mW) and an EMCCD DU-897 Andor camera. Images were acquired with the following protocol, a Z stack of 25 plans (0.13 microns step) was acquired. Images were then reconstructed using Nikon elements software and three-dimensional maximum intensity projections of 7 plans were generated using Image J.

Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)

TIRF microscopy sequences were acquired on a Nikon Eclipse Ti inverted microscope equipped with a NA1.47 100x TIRF objective, a TIRM arm and a temperature controller. pHluorin and mCherry were excited with a 491 and 560 nm

laser, respectively (Roper Scientific). Simultaneous fluorescent emissions were captured using a image splitter (Dual View) in front of a QuantEM 512SC EM CCD camera (Roper Scientific). The system was driven by the Metamorph software. Image sequences were recorded in stream mode, during 1 min at 100 ms frame rate.

Exocytosis events counting

Exocytosis events were counted from movies generated by TIRF microscopy using an algorithm previously described (Boulanger et al., 2010a).

Tubule length measurement

To measure the length of the tubules, a score map is defined as a function of the Eigen values (l_1 and l_2 with $l_1 < l_2$) of the Hessian (2nd order derivative matrix) of the

$$\text{image by, } \begin{cases} -\frac{l_1}{\sqrt{\epsilon+l_2^2}} & \text{if } l_1 < -\delta \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

The score map is then thresholded and the pixels linked to reconstruct filaments. Subsequently, a subpixel localization is obtained by alternating a Mean Shift algorithm along the orthogonal direction of the filament and a curvilinear regular resampling.

Colocalization analysis

Pearson's coefficient was calculated on Icy software (<http://icy.bioimageanalysis.org>) using "Colocalization Studio" plugin.

Liposome flotation assay

Liposomes were prepared in mass ratio composition of 87% POPC, 3% Lissamine rhodamine phosphatidyl ethanolamine and 10% of POPC, POPA or POPS in Hepes/NaCl buffer (25 mM Hepes pH 7.3, 150 mM NaCl). 800 nM of GST-PACSIN3 or His-MICAL-L1 C-term purified proteins were incubated with 500 μ M of each liposome preparation for 30 min at room temperature. Samples were adjusted to 55% sucrose and loaded at the bottom of a Beckman SW55 Ti centrifugation tube. Samples were then overlaid by a discontinuous sucrose gradient (50%, 40%, 30%, 20%) and Hepes/NaCl buffer was added on the top of the tube. Liposomes were centrifuged at 150,000 x g for 4 hours at 4°C. Fractions were collected from the top and separated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblot using Rabbit polyclonal anti-MICAL-L1 and anti-PACSIN3 antibodies

Preparation of giant unilamellar vesicles (GUVs)

GUVs were prepared by the electroformation method using conducting Indium Tin Oxide coated glass slides (ITO, Präzisions glas & optik GmBH, Germany)(Mathivet et al., 1996; Meleard et al., 2009; Morales-Pennington et al., 2010). A lipid solution of 10 μ L was deposited on the ITO slides by using a 5 μ l Hamilton syringe to make a dry lipid film as thin as possible. The lipid coated ITO slides were dried under vacuum for 45 min at room temperature. The lipid coated ITO glass slides were assembled by using sigillum wax (Vitrex, Denmark). The lipid films were then hydrated with a sucrose/tris growth buffer (100mM of sucrose and 10mM of tris, at pH 7.4) by applying a sine AC current at 1V (peak to peak) and frequency of 10 Hz for 45-90 min at room temperature. GUVs were extracted by pipetting directly from GUV-rich regions from the formation chamber. The collected GUVs were then transferred in a

NaCl/tris observation buffer (70 mM of NaCl and 10 mM of tris, at pH 7.4) with an osmolarity of 10-20 mmol/kg higher than that of the growth buffer.

Protein-membrane binding assay

Observation chambers were prepared by using 60x24mm coverslips (Menzel-Gläser, Germany) and 40x22mm coverslips (VWR International, France). Before using, the chambers were passivated by a 5 mg/mL β -casein solution (100mM of NaCl and 10mM tris, at pH7.4) for a 15-30 min to prevent GUVs from adhering to the glass surface. The chamber was then rinsed several times and filled with the observation buffer. GUVs were incubated with MICAL-L1 at a concentration of 0.5 μ M in the observation buffer. The protein was allowed to bind to the GUVs for 20-40 min on ice before observation.

GUVs were observed with a spinning disk confocal microscope equipped on an inverted Nikon Eclipse Ti-E microscope with 100x oil objective. Images were recorded with an EM-CCD Evolve camera. The exposure time for all the images was 50 ms.

EGFR degradation assay

Cells were serum starved for 3 h in the presence of 40 μ g/ml cycloheximide (Sigma) and then stimulated with 100 ng/ml EGF in presence of cycloheximide for 15 min at 37°C. Cells were washed and chased in medium with FCS plus CHX for the indicated time points. Cells were lysed and cell extracts were separated by SDS-PAGE and analyzed with polyclonal anti-EGFR antibodies. Protein bands were quantified using Image J software.

Statistical analysis

Data sets were analyzed by Student's Test two tailed-paired t test analysis. The p values are indicated for each experiment.

Acknowledgments

We thank Dr's Marcus Plomann (university of Köln), Guangwei Du (university of Texas, Houston), and David Perrais (IINS, Bordeaux) for providing PACSIN3 cDNA, GFP-PASS and mRFP-PASS4E probes and pHluorin-TfR, respectively. We thank Dr's Ludger Johannes and Christian Wunder for help with lipid binding experiments, Drs Ahmed El Marjou and Aurore Berthier for help with protein purification and Dr Jamil Jubrail for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the French National Center for Scientific Research (CNRS), the National Institute for Health and medical Research (INSERM), the University of Paris Descartes, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DEQ20130326518), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-MICAD; NANR-08Biot-015-01, and ANR-10-INBS-04) the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Curie Institute. The PICT-IBiSA, Cell and Tissue Imaging Center Institut Curie, is a member of the "France-BioImaging" National Research Infrastructure. R.S. is a recipient of a fellowship from the University of Paris Descartes.

References

- Abou-Zeid, N., R. Pandjaitan, L. Sengmanivong, V. David, G. Le Pavec, J. Salamero, and A. Zahraoui. 2011. MICAL-like1 mediates epidermal growth factor receptor endocytosis. *Mol Biol Cell.* 22:3431-3441.
- Babbey, C.M., N. Ahktar, E. Wang, C.C. Chen, B.D. Grant, and K.W. Dunn. 2006. Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell.* 17:3156-3175.
- Bai, X., G. Meng, M. Luo, and X. Zheng. 2012. Rigidity of wedge loop in PACSIN 3 protein is a key factor in dictating diameters of tubules. *J Biol Chem.* 287:22387-22396.

- Bantel-Schaal, U., I. Braspenning-Wesch, and J. Kartenbeck. 2009. Adeno-associated virus type 5 exploits two different entry pathways in human embryo fibroblasts. *J Gen Virol.* 90:317-322.
- Boulanger, J., A. Gidon, C. Kervran, and J. Salamero. 2010a. A patch-based method for repetitive and transient event detection in fluorescence imaging. *PLoS one.* 5:e13190.
- Boulanger, J., C. Kervran, P. Bouthemy, P. Elbau, J.B. Sibarita, and J. Salamero. 2010b. Patch-based nonlocal functional for denoising fluorescence microscopy image sequences. *IEEE Trans Med Imaging.* 29:442-454.
- Braun, A., R. Pinyol, R. Dahlhaus, D. Koch, P. Fonarev, B.D. Grant, M.M. Kessels, and B. Qualmann. 2005. EHD proteins associate with syndapin I and II and such interactions play a crucial role in endosomal recycling. *Mol Biol Cell.* 16:3642-3658.
- Caplan, S., N. Naslavsky, L.M. Hartnell, R. Lodge, R.S. Polishchuk, J.G. Donaldson, and J.S. Bonifacio. 2002. A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *EMBO J.* 21:2557-2567.
- Daumke, O., R. Lundmark, Y. Vallis, S. Martens, P.J. Butler, and H.T. McMahon. 2007. Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. *Nature.* 449:923-927.
- Doherty, G.J., and H.T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 78:857-902.
- Gidon, A., S. Bardin, B. Cinquin, J. Boulanger, F. Waharte, L. Heliot, H. de la Salle, D. Hanau, C. Kervran, B. Goud, and J. Salamero. 2012. A Rab11A/myosin Vb/Rab11-FIP2 complex frames two late recycling steps of langerin from the ERC to the plasma membrane. *Traffic.* 13:815-833.
- Giridharan, S.S., B. Cai, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2012. Trafficking cascades mediated by Rab35 and its membrane hub effector, MICAL-L1. *Commun Integr Biol.* 5:384-387.
- Giridharan, S.S., B. Cai, N. Vitale, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2013. Cooperation of MICAL-L1, syndapin2, and phosphatidic acid in tubular recycling endosome biogenesis. *Mol Biol Cell.* 24:1776-1790, S1771-1715.
- Grant, B.D., and S. Caplan. 2008. Mechanisms of EHD/RME-1 protein function in endocytic transport. *Traffic.* 9:2043-2052.
- Grant, B.D., and J.G. Donaldson. 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:597-608.
- Guilherme, A., N.A. Soriano, P.S. Furcinitti, and M.P. Czech. 2004. Role of EHD1 and EHBP1 in perinuclear sorting and insulin-regulated GLUT4 recycling in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 279:40062-40075.
- Gustafsson, M.G., L. Shao, P.M. Carlton, C.J. Wang, I.N. Golubovskaya, W.Z. Cande, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 2008. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J.* 94:4957-4970.
- Hattula, K., J. Furuholm, J. Tikkanen, K. Tanhuanpaa, P. Laakkonen, and J. Peranen. 2006. Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *J Cell Sci.* 119:4866-4877.
- Hickson, G.R., J. Matheson, B. Riggs, V.H. Maier, A.B. Fielding, R. Prekeris, W. Sullivan, F.A. Barr, and G.W. Gould. 2003. Arfophilins are dual Arf/Rab 11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to Drosophila nuclear fallout. *Mol Biol Cell.* 14:2908-2920.
- Itoh, T., K.S. Erdmann, A. Roux, B. Habermann, H. Werner, and P. De Camilli. 2005. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell.* 9:791-804.
- Jovanovic, O.A., F.D. Brown, and J.G. Donaldson. 2006. An effector domain mutant of Arf6 implicates phospholipase D in endosomal membrane recycling. *Mol Biol Cell.* 17:327-335.
- Jovic, M., N. Naslavsky, D. Rapaport, M. Horowitz, and S. Caplan. 2007. EHD1 regulates beta1 integrin endosomal transport: effects on focal adhesions, cell spreading and migration. *J Cell Sci.* 120:802-814.

- Kobayashi, H., K. Etoh, N. Ohbayashi, and M. Fukuda. 2014. Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-L1 during neurite outgrowth. *Biol Open*. 3:803-814.
- Kohler, K., D. Louvard, and A. Zahraoui. 2004. Rab13 regulates PKA signaling during tight junction assembly. *J Cell Biol*. 165:175-180.
- Kouranti, I., M. Sachse, N. Arouche, B. Goud, and A. Echard. 2006. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol*. 16:1719-1725.
- Linder, M.D., R.L. Uronen, M. Holtta-Vuori, P. van der Sluijs, J. Peranen, and E. Ikonen. 2007. Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol Biol Cell*. 18:47-56.
- Magadan, J.G., M.A. Barbieri, R. Mesa, P.D. Stahl, and L.S. Mayorga. 2006. Rab22a regulates the sorting of transferrin to recycling endosomes. *Mol Cell Biol*. 26:2595-2614.
- Marzesco, A.M., I. Dunia, R. Pandjaitan, M. Recouvreur, D. Dauzonne, E.L. Benedetti, D. Louvard, and A. Zahraoui. 2002. The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 13:1819-1831.
- Mathivet, L., S. Cribier, and P.F. Devaux. 1996. Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophys J*. 70:1112-1121.
- Meleard, P., L.A. Bagatolli, and T. Pott. 2009. Giant unilamellar vesicle electroformation from lipid mixtures to native membranes under physiological conditions. *Methods Enzymol*. 465:161-176.
- Merrifield, C.J., D. Perrais, and D. Zenisek. 2005. Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell*. 121:593-606.
- Modregger, J., B. Ritter, B. Witter, M. Paulsson, and M. Plomann. 2000. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci*. 113 Pt 24:4511-4521.
- Morales-Pennington, N.F., J. Wu, E.R. Farkas, S.L. Goh, T.M. Konyakhina, J.Y. Zheng, W.W. Webb, and G.W. Feigenson. 2010. GUV preparation and imaging: minimizing artifacts. *Biochim Biophys Acta*. 1798:1324-1332.
- Morimoto, S., N. Nishimura, T. Terai, S. Manabe, Y. Yamamoto, W. Shinahara, H. Miyake, S. Tashiro, M. Shimada, and T. Sasaki. 2005. Rab13 mediates the continuous endocytic recycling of occludin to the cell surface. *J Biol Chem*. 280:2220-2228.
- Naslavsky, N., J. Rahajeng, M. Sharma, M. Jovic, and S. Caplan. 2006. Interactions between EHD proteins and Rab11-FIP2: a role for EHD3 in early endosomal transport. *Mol Biol Cell*. 17:163-177.
- Naslavsky, N., R. Weigert, and J.G. Donaldson. 2004. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol Biol Cell*. 15:3542-3552.
- Nichols, B.J., and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*. 11:406-412.
- Nonnenmacher, M., and T. Weber. 2011. Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe*. 10:563-576.
- Qualmann, B., D. Koch, and M.M. Kessels. 2011. Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO J*. 30:3501-3515.
- Quan, A., and P.J. Robinson. 2013. Syndapin--a membrane remodelling and endocytic F-BAR protein. *FEBS J*. 280:5198-5212.
- Rahajeng, J., S.S. Giridharan, B. Cai, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2010. Important relationships between Rab and MICAL proteins in endocytic trafficking. *World J Biol Chem*. 1:254-264.
- Rahajeng, J., S.S. Giridharan, B. Cai, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2012. MICAL-L1 is a tubular endosomal membrane hub that connects Rab35 and Arf6 with Rab8a. *Traffic*. 13:82-93.
- Reinecke, J.B., D. Katafiasz, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2015. Novel functions for the endocytic regulatory proteins MICAL-L1 and EHD1 in mitosis. *Traffic*. 16:48-67.

- Roxrud, I., C. Raiborg, N.M. Pedersen, E. Stang, and H. Stenmark. 2008. An endosomally localized isoform of Eps15 interacts with Hrs to mediate degradation of epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol.* 180:1205-1218.
- Senju, Y., Y. Itoh, K. Takano, S. Hamada, and S. Suetsugu. 2011. Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J Cell Sci.* 124:2032-2040.
- Sharma, M., S.S. Giridharan, J. Rahajeng, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2009. MICAL-L1 links EHD1 to tubular recycling endosomes and regulates receptor recycling. *Mol Biol Cell.* 20:5181-5194.
- Shi, A., S. Pant, Z. Balklava, C.C. Chen, V. Figueroa, and B.D. Grant. 2007. A novel requirement for *C. elegans* Alix/ALX-1 in RME-1-mediated membrane transport. *Curr Biol.* 17:1913-1924.
- Sibarita, J.B. 2005. Deconvolution microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 95:201-243.
- Terai, T., N. Nishimura, I. Kanda, N. Yasui, and T. Sasaki. 2006. JRAB/MICAL-L2 is a junctional Rab13-binding protein mediating the endocytic recycling of occludin. *Mol Biol Cell.* 17:2465-2475.
- Ullrich, O., S. Reinsch, S. Urbe, M. Zerial, and R.G. Parton. 1996. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol.* 135:913-924.
- van der Sluijs, P., M. Hull, P. Webster, P. Male, B. Goud, and I. Mellman. 1992. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell.* 70:729-740.
- Weigert, R., A.C. Yeung, J. Li, and J.G. Donaldson. 2004. Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol Biol Cell.* 15:3758-3770.
- Zhang, F., Z. Wang, M. Lu, Y. Yonekubo, X. Liang, Y. Zhang, P. Wu, Y. Zhou, S. Grinstein, J.F. Hancock, and G. Du. 2014. Temporal production of the signaling lipid phosphatidic acid by phospholipase D2 determines the output of extracellular signal-regulated kinase signaling in cancer cells. *Mol Cell Biol.* 34:84-95.

Fig. 1

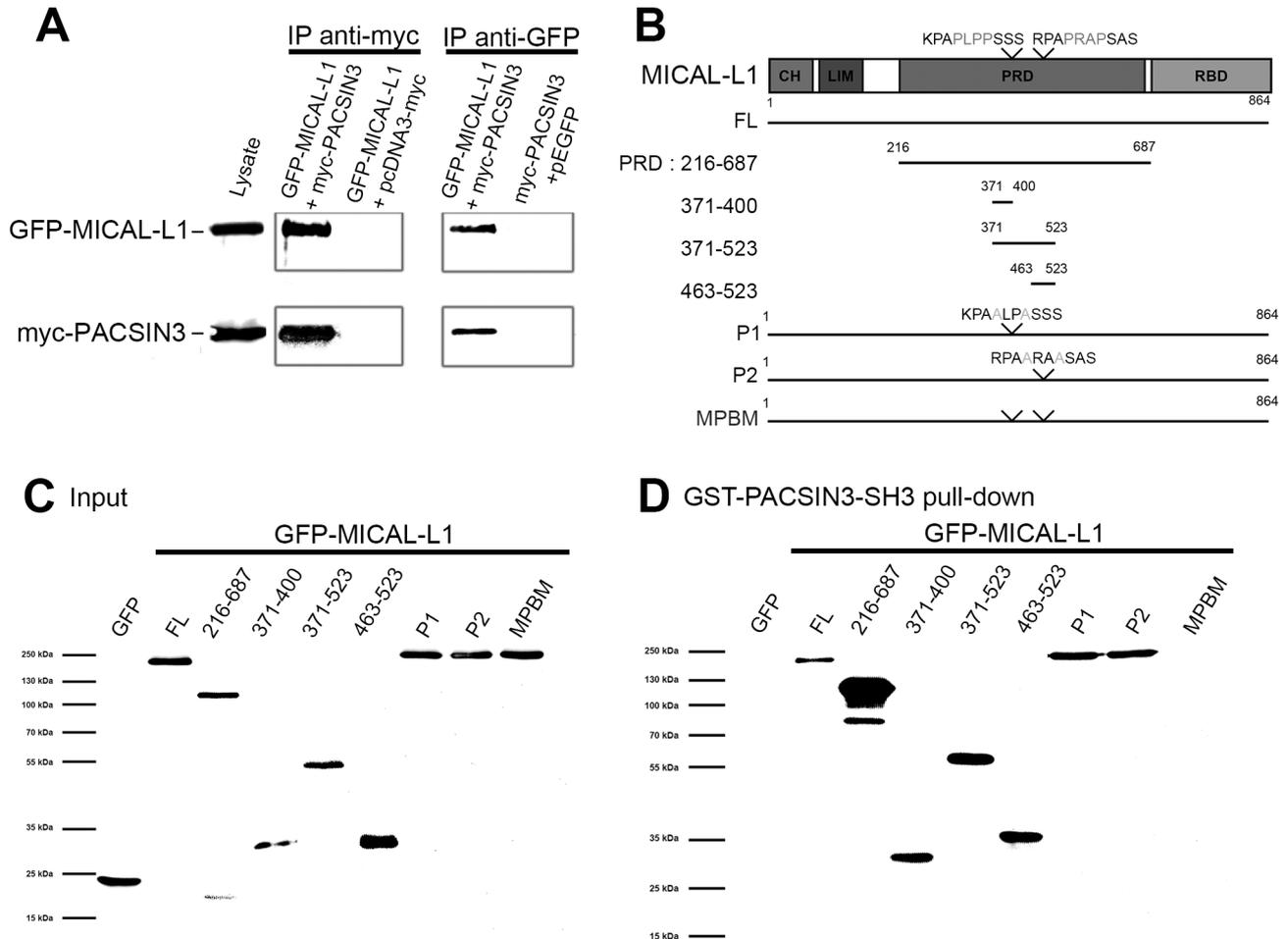
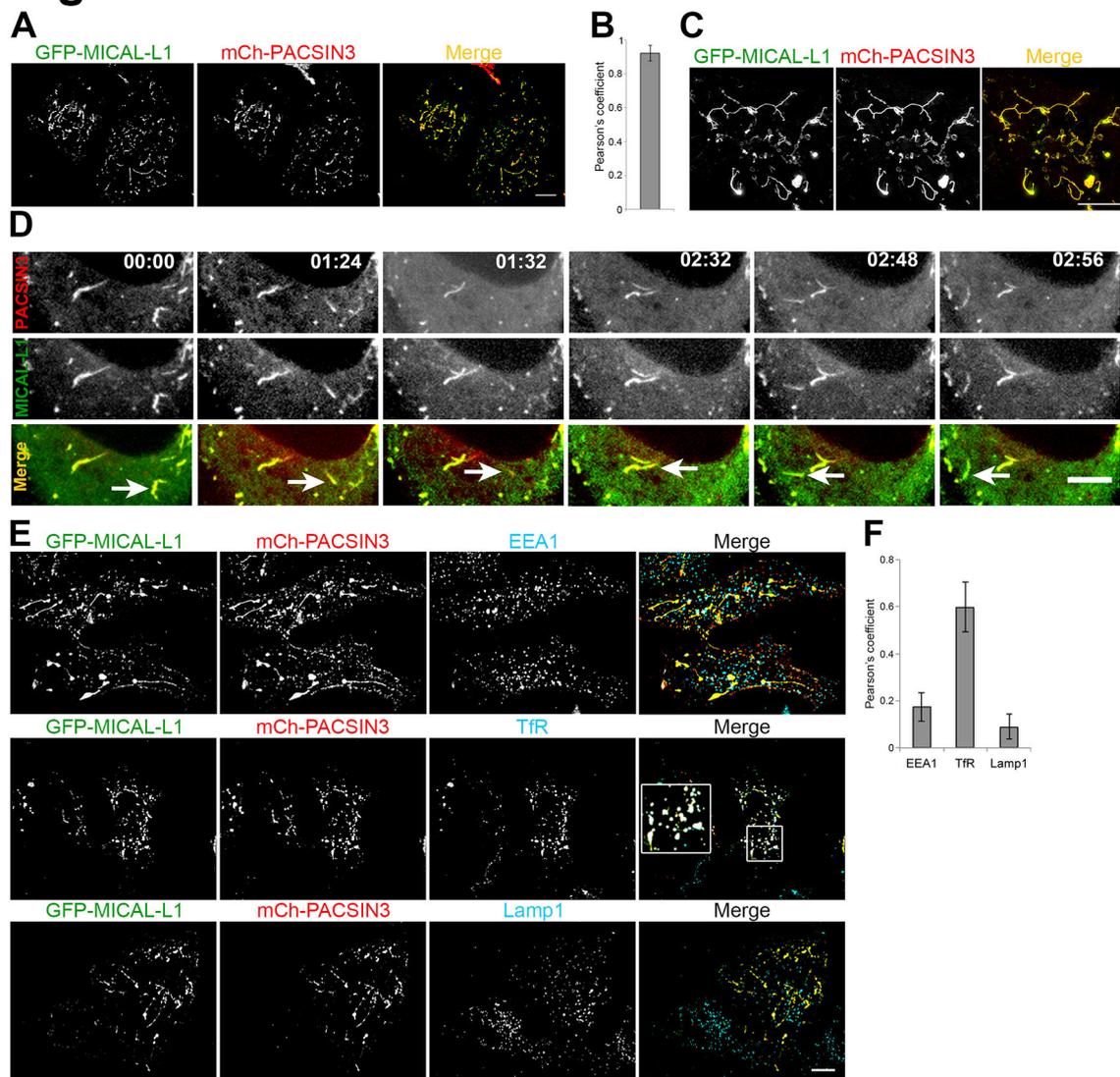


Figure 1, Interaction of MICAL-L1 and PACSIN3

(A) HeLa cells cotransfected with GFP-MICAL-L1 and myc-PACSIN3, pcDNA3-myc and pEGFP vector were subjected to immunoprecipitation with anti-GFP or anti-myc antibodies and analyzed by immunoblotting with anti-GFP or anti-myc antibodies. (B) Schematic domain organization of MICAL-L1, CH (Calponin Homology domain); LIM (Lin11, Isl-1, Mec-3 domain); PRD (Proline Rich Domain); RBD (Rab Binding Domain). P1 and P2 are mutants of MICAL-L1 protein. P1 mutation: PLPP into ALPA (amino acids 385-388); P2 mutation, PRAP into ARAA (amino acids 480-483); MPBM (MICAL-L1- PACSIN3 Binding Motif) were generated by mutation of PLPP to ALPA and PRAP to ARAA. (C) input showing the expression of different GFP-MICAL-L1 constructs. (D) GST-SH3-PACSIN3 pull-down experiments, HeLa cell lysates expressing GFP-MICAL-L1FL or different MICAL-L1 constructs were incubated with (Figure S1B) GST or (D) GST-SH3 domain of PACSIN3 beads. After washing, bound proteins were analyzed by immunoblot with monoclonal anti-GFP antibody.

Fig. 2**Figure 2, MICAL-L1 and PACSIN3 colocalize in a tubulo-vesicular network.**

Coverslips of HeLa cells coexpressing GFP-MICAL-L1 and mCherry-PACSIN3 were fixed and analyzed by immunofluorescence (A) wide-field microscopy, 3D stacks were acquired and images were deconvoluted. (B) GFP-MICAL-L1 and mCherry-PACSIN3 colocalization was quantified using Pearson's coefficient (n=50 cells). (C) Cells were imaged using SIM microscopy. Images show MICAL-L1/PACSIN3 membrane tubules structures in the cytoplasm. The projections of the two fluorophores (green and red) was revealed by the yellow color resulting from their overlapping emissions. Three-dimensional projections of images are shown. Bars, 10 μ m. (D) Gallery of images taken from live videomicroscopy (500 ms interval) of HeLa cells cotransfected with GFP-MICAL-L1 and mCherry-PACSIN3 (see video1). Arrows indicate tubules movement over time. Bar, 2 μ m (E) Coverslips of cells expressing GFP-MICAL-L1 and mCherry-PACSIN3 were processed for immunofluorescence using mouse monoclonal anti-EEA1, anti-TfR and anti-Lamp1 antibodies. Three-dimensional projections of images were collected. The projections were combined into a single color image in the third column (merge). The colocalization of MICAL-L1 and TfR was emphasized in the 2.0 \times insets. Bar, 10 μ m and (F) quantification of MICAL-L1/PACSIN3 colocalization (using Pearson's coefficient) with EEA1, TfR and Lamp1 (n=20 cells). The distribution of MICAL-L1 and PACSIN3 is significantly correlated with that of the TfR. Pearson's coefficient was performed on full image fields of reconstituted MIP of 3D stacks. At least five double-labeled cells were analyzed in each field. Average quantification as shown in bar graphs was done on at least three different experiments. Data represent mean \pm SEM.

Fig. 3

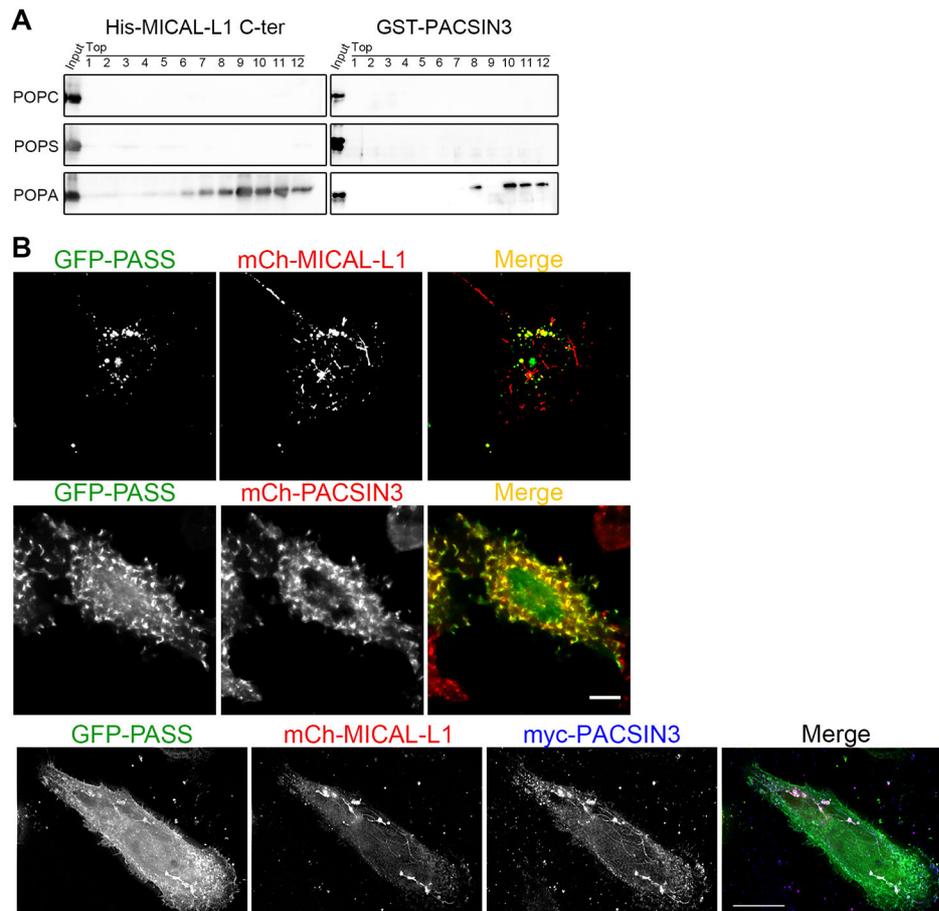


Fig. 3, MICAL-L1/PACSIN3 complex binds phosphatidic acid.

(A) Purified His-MICAL-L1 C-terminal (C-ter) and GST-PACSIN3 were incubated with liposomes enriched in PA, PS or PC as control. After incubation material was submitted to a flotation assay and centrifuged. Different fractions were collected and analyzed by western blot using anti-MICAL-L1 or anti-PACSIN3 antibodies. (B) Coverslips of HeLa cells were cotransfected with GFP-PASS and mCherry-MICAL-L1 or GFP-PASS and mCherry-PACSIN3 or GFP-PASS, mCherry-MICAL-L1 and myc-PACSIN3. Cells were fixed and analyzed by immunofluorescence. Three-dimensional stacks were acquired and images were deconvoluted. Three-dimensional projections of images are shown. Bars, 10 μ m.

Fig. 4

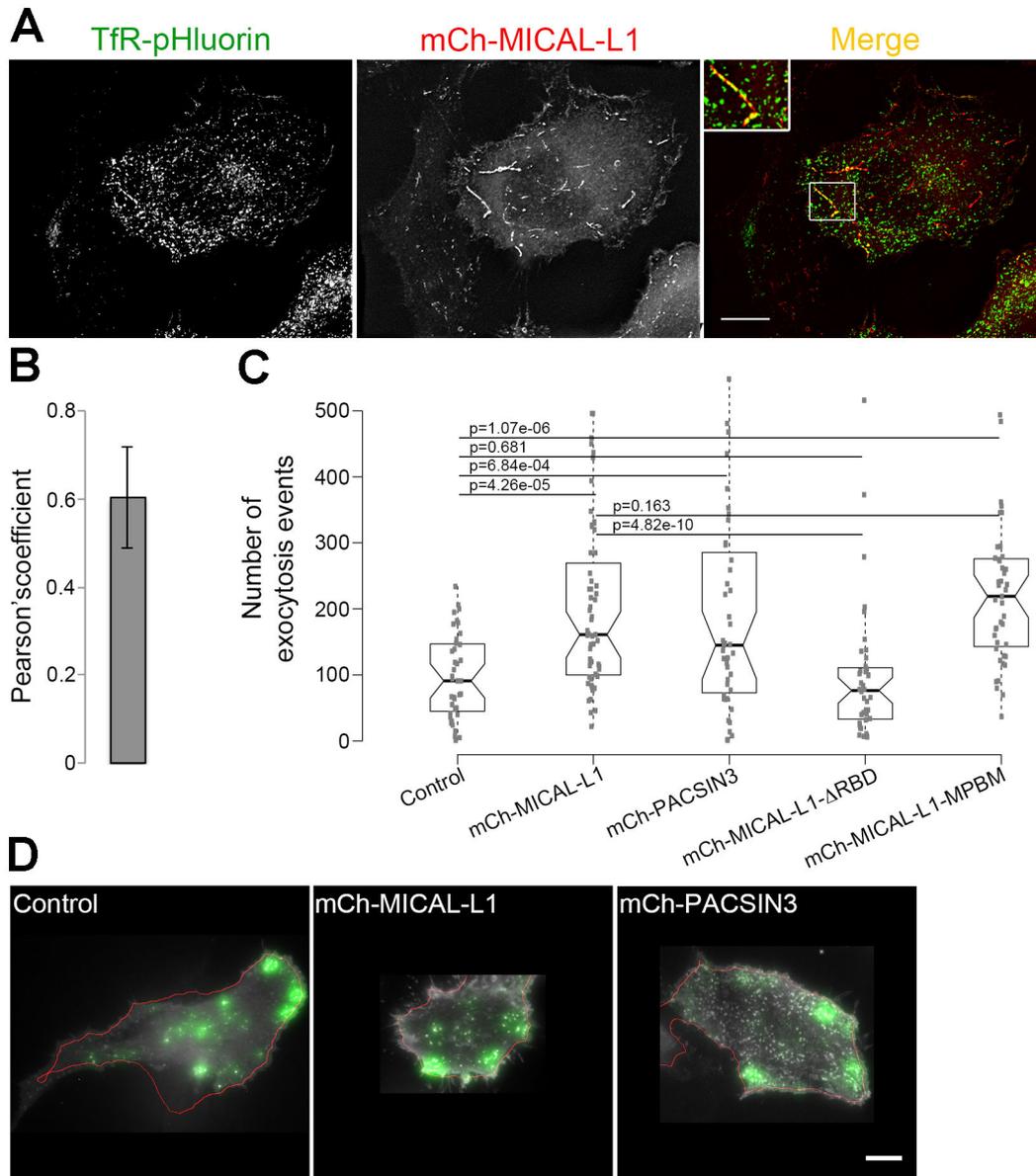


Figure 4, MICAL-L1 and PACSIN3 stimulate TfR recycling.

(A) HeLa cells coexpressing TfR-pHluorin and mCherry-MICAL-L1 were fixed and analyzed by immunofluorescence. Three-dimensional stacks were acquired by 3D deconvolution microscopy. Three-dimensional projections of images are shown. mCherry-MICAL-L1 and TfR-pHluorin colocalization was emphasized in the $2.0 \times$ insets. Bar $10 \mu\text{m}$. (B) Colocalization of TfR-pHluorin and mCherry-MICAL-L1 was quantified using Pearson's coefficient ($n=20$ cells). (C) TfR exocytosis events in cells coexpressing TfR-pHluorin and either mCherry alone as a control ($n=39$ cells), mCherry-MICAL-L1 ($n=58$ cells), mCherry-PACSIN3 ($n=40$ cells), mCherry-MICAL-L1 Δ RBD ($n=32$ cells), or mCherry-MICAL-L1MPBM mutant ($n=43$ cells) were imaged by TIRF microscopy and exocytosis events were quantified as indicated in the method section. P values are indicated. (D) Density maps of exocytosis events in single cells coexpressing TfR-pHluorin and either mCherry alone, mCherry-MICAL-L1 or mCherry-PACSIN3. Green spots represent the hot spots sites where exocytosis of TfR-pHluorin occurs.

Fig. 5

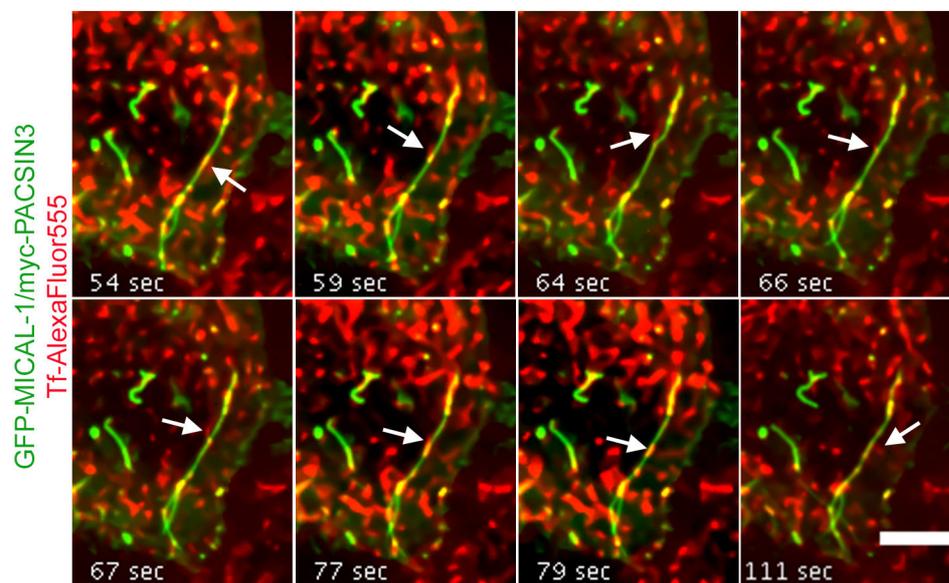


Figure 5, MICAL-L1/PACSIN3 and Tf-AlexaFluor555 are associated with a dynamic tubulo-vesicular network.

HeLa cells transiently coexpressing GFP-MICAL-L1 and myc-PACSIN3 were starved for 30 min and transferrin-AlexaFluor555 was added at 10 $\mu\text{g/ml}$. Cells were imaged by video spinning confocal microscopy at 37°C. Images were collected at 500 ms intervals (50 ms exposure per channel). A gallery of a sequence of eight images (from 54 to 111 seconds) indicates the dynamic of Tf-AlexaFluor555 positive endosomes and MICAL-L1/PACSIN3 tubules. Arrows denote Tf-AlexaFluor555 cargoes which segregate from a MICAL1/PACSIN3 tubule. Bar, 5 μm . A movie containing these images (0–2 min) highlights an example of GFP-MICAL-L1 /mycPACSIN3/ Tf-AlexaFluor555 positive recycling endosomes behavior is shown (videos 7-8).

Fig. 6

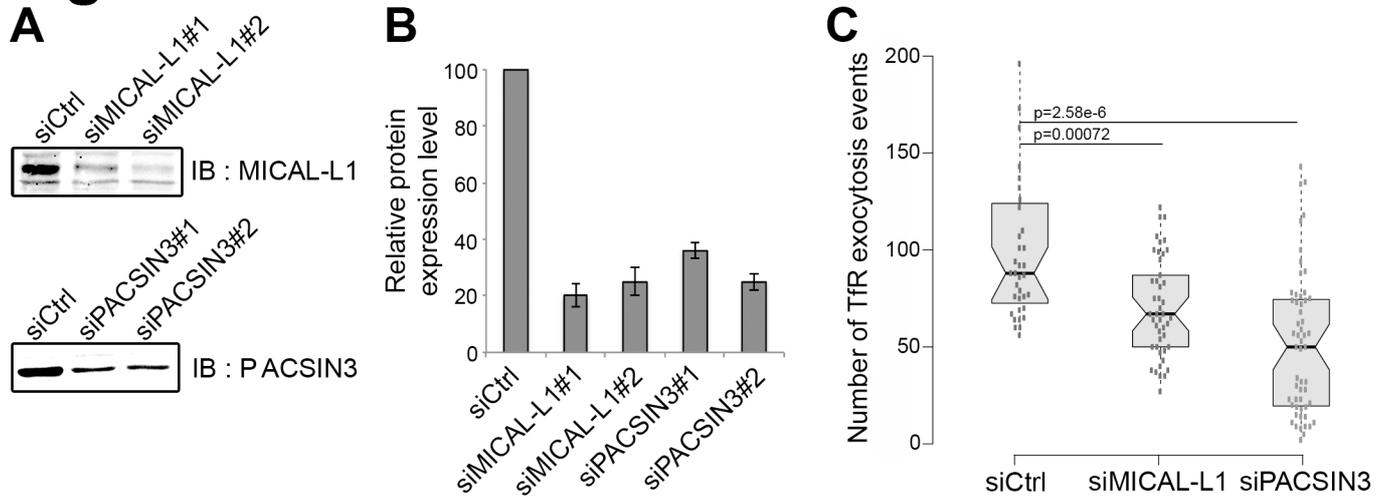


Figure 6, MICAL-L1 and PACSIN3 depletions inhibit TfR recycling.

(A) HeLa cells were transfected with 2 different siRNA targeting human MICAL-L1 mRNA sequence or human PACSIN3 mRNA sequence. Control cells were transfected with siRNA targeting GFP. Cells were lysed and analyzed by western blot using anti-MICAL-L1 or anti-PACSIN3 antibodies. Equal amounts of proteins were loaded for immunoblotting (B) Expression level of MICAL-L1 and PACSIN3 proteins was quantified and compared to control cells using image J. (C) Quantification of TfR-pHI exocytosis events in cells expressing TfR-pHIuorin and silenced for MICAL-L1 (n=45), PACSIN3 (n=55) and GFP as control (n=36), using TIRF microscopy. P values are indicated for each conditions compared with control.

Fig. 7

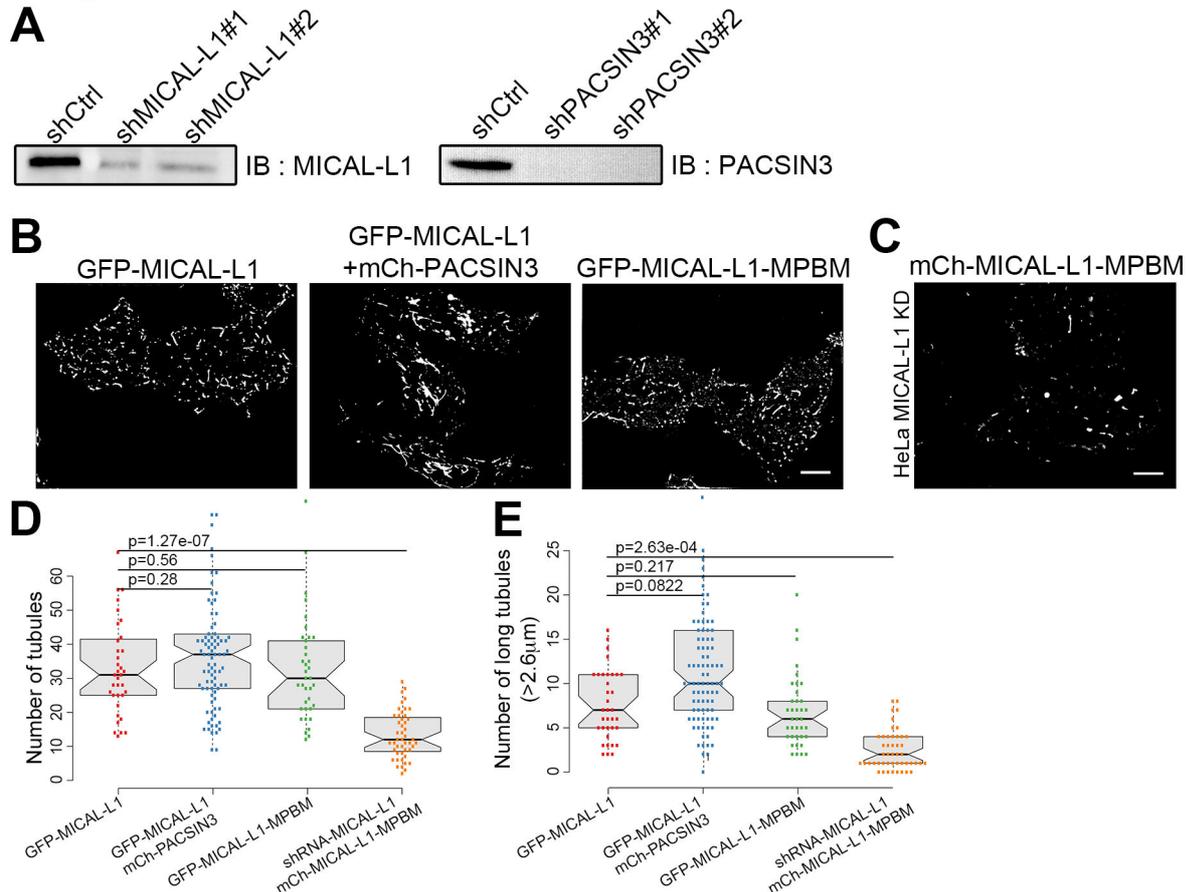


Figure 7, Cooperation of PACSIN3 and MICAL-L1 in membrane tubules formation.

(A) HeLa cells stably expressing 2 different shRNAs targeting human MICAL-L1, human PACSIN3 or scrambled (shCtrl) sequences were lysed and analyzed by western blot using anti-MICAL-L1 or anti-PACSIN3 antibodies respectively. Depletion of the proteins is > 80%. (B) HeLa cells were transfected with GFP-MICAL-L1, GFP-MICAL-L1 and mCherry-PACSIN3, GFP-MICAL-L1MPBM mutant. (C) HeLa cells stably expressing shRNA targeting human MICAL-L1 (MICAL-L1 KD) were transfected with shRNA resistant mCherry-MICAL-L1MPBM. Cells were fixed and analyzed by immunofluorescence. Three-dimensional stacks were acquired and images were deconvoluted. Three-dimensional projections of images are shown. Bars, 10 μ m. (D-E) Quantification of tubules number and length from three independent experiments performed as in B-C; (D) tubules number and (E) tubules length > 2.6 μ m in cells expressing GFP-MICAL-L1, GFP-MICAL-L1 and mCherry-PACSIN3, GFP-MICAL-L1MPBM or in cells knocked-down for human MICAL-L1 and expressing shRNA resistant mCherry-MICAL-L1MPBM (n=30 cells per condition).

Fig. 8

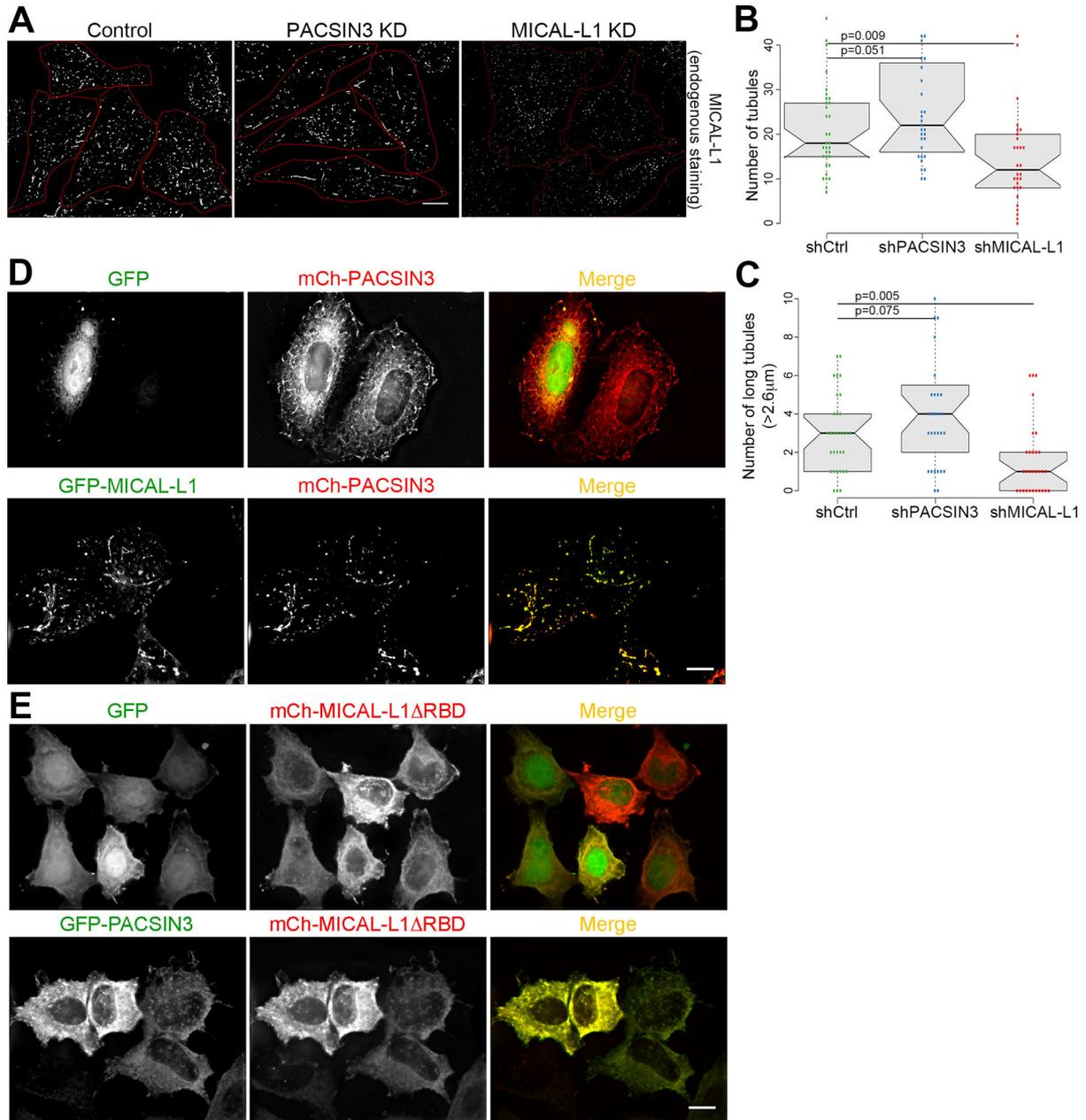
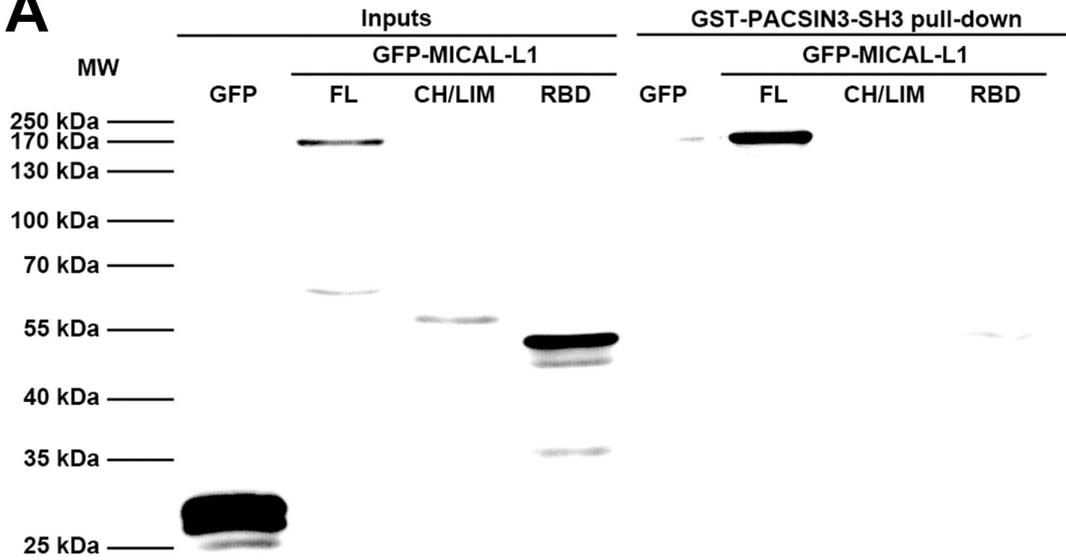


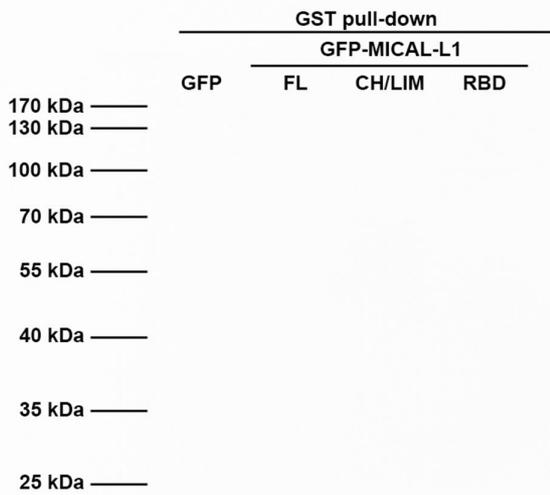
Figure 8, MICAL-L1 is required for membrane tubules formation and for PACSIN3 localization
 (A) HeLa cells stably transfected with shRNA targeting human scrambled (control), MICAL-L1 or PACSIN3 were fixed and analyzed by immunofluorescence with anti-MICAL-L1 antibody. Three-dimensional stacks were acquired and images were deconvoluted. Three-dimensional projections of images are shown. Bars 10 μm. (B-C) Quantification of tubules number and length from three independent experiments performed as in A. (B) MICAL-L1 tubules number and (C) MICAL-L1 tubules length >2.6 μm were quantified (n=20 cells per condition) in control cells or in cells knocked down for MICAL-L1 or PACSIN3. Silencing MICAL-L1 reduced the number and length of membrane tubules. (D-E) Cells were cotransfected with (D) GFP and mCherry-PACSIN3 or GFP-MICAL-L1 and mCherry-PACSIN3 or (E) GFP and mCherry-MICAL-L1ΔRBD or GFP-PACSIN3 and mCherry-MICAL-L1ΔRBD. Cells were fixed and analyzed as indicated in A. Three-dimensional projections of images are shown. Bars, 10 μm.

Fig. S1

A



B



C

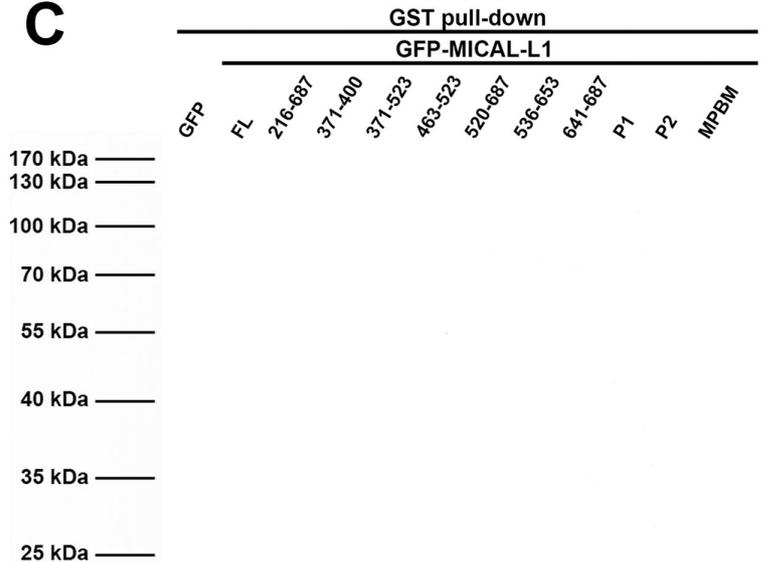


Figure S1, PACSIN3 interacts with the PRD domain of MICAL-L1 but not with CH/LIM and RBD domains

(A) HeLa cells were transfected with GFP alone or with different constructs of MICAL-L1 fused to GFP (FL, full length; CH/LIM, CH and LIM domains, RBD, RBD domain), input showing the expression of GFP-MICAL-L1 constructs. Cell extracts were incubated with (A, right panel) GST-PACSIN3-SH3 beads or (B) GST alone. (C) Control experiments for figure 1D. GST pull-down experiments were performed with GST alone using HeLa cells lysates from cells expressing different constructs of MICAL-L1 (figure 1B). Bound material was analyzed by immunoblot with anti-GFP antibody.

Fig. S2

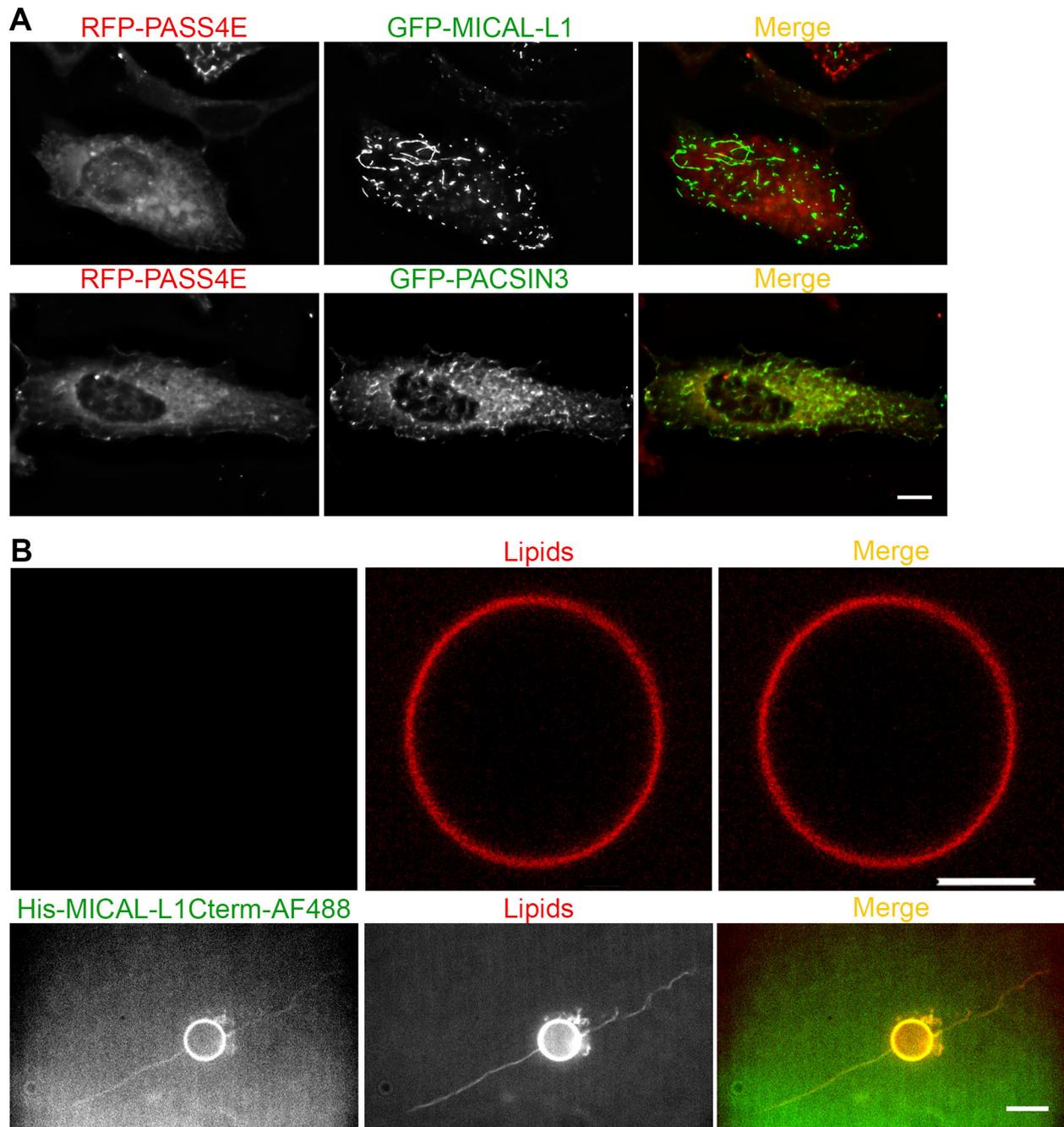


Fig. S2, (A) Coverslips of HeLa cells expressing GFP-MICAL-L1 and mRFP-PASS4E or GFP-PACSIN3 and mRFP-PASS4E were fixed and analyzed by immunofluorescence. Three-dimensional stacks were acquired and images were deconvoluted. Three-dimensional projections of images are shown. Bars, 10 μ m. (B) PA-containing GUVs were incubated with or without MICAL-L1 C-ter coupled to AlexaFluor488. Samples were imaged by spinning confocal microscopy. Images of MICAL-L1 C-ter (green), GUVs (red), and merge (yellow) are shown. Bar, 10 μ m

Fig. S3

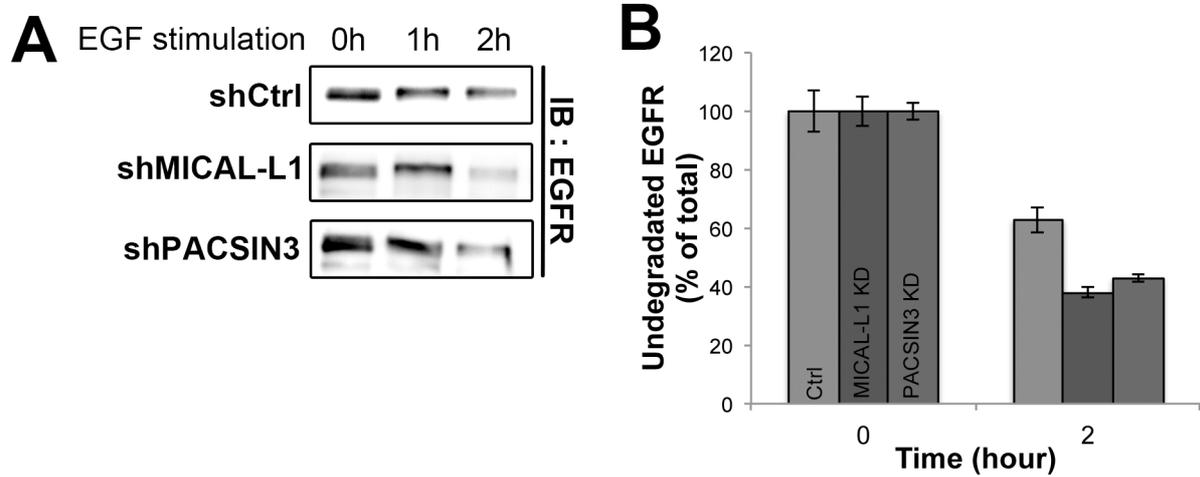


Fig. S3, Knocking down MICAL-L1 and PACSIN3 stimulate EGFR degradation

(A) HeLa cells stably expressing shRNA targeting human MICAL-L1, human PACSIN3 or control sequences were serum starved for 3h in the presence of 40 μ g/ml cyclohexamide and then stimulated with 100 ng/ml EGF in the presence of cyclohexamide. They were washed and chased for 1 and 2 h, then lysed and endogenous EGFR was analyzed by western blot using anti-EGFR antibody. (B) Quantification of 3 independent experiments performed as in A. Undegraded EGFR was quantified using Image J.

Video legends

Video 1, MICAL-L1 and PACSIN3 colocalizes in living cells.

HeLa cells transiently coexpressing GFP-MICAL-L1 and mCherry-PACSIN3 were imaged by video spinning confocal microscopy at 37°C. Images were collected at 500 ms intervals (50 ms exposure per channel). A representative double color movie is presented for GFP-MICAL-L1 (green) and mCherry-PACSIN3 (red) as a maximum Z projection of 5 planes (7 fps; 3 min of acquisition).

Videos 2-3, MICAL-L1 C-ter induces tubulation of PA-containing GUVs

In vitro tubulation assays were performed with PA-containing GUVs and MICAL-L1 C-ter coupled to AlexaFluor 488. After incubation, samples were imaged by video spinning confocal microscopy at room temperature. Images were collected at 100 ms intervals (50 ms exposure per channel). Representative movies are presented for GUVs (video 2) and MICAL-L1 C-ter (video 3), (15 fps; 20-s of acquisition).

Videos 4-6, MICAL-L1 and PACSIN3 stimulate TfR recycling.

HeLa cells transiently coexpressing TfR-pHl and (video4) mCherry, (video5) mCherry-MICAL-L1, and (video6) mCherry-PACSIN3 were analyzed by TIRF videomicroscopy. Movies are presented as single color movies of TfR-pHl fluorescence (10 fps; 1 min acquisition).

Videos 7-8, MICAL-L1/PACSIN3 tubules contain labeled transferrin.

HeLa cells transiently coexpressing GFP-MICAL-L1 and myc-PACSIN3 were starved for 30 min and then incubated at 37°C with 10 µg/ml of transferrin-AlexaFluor555.

Cells were imaged by video spinning confocal microscopy at 37°C. 2 representative movies are presented for GFP-MICAL-L1 (green) and transferrin-AlexaFluor555 (red) as a maximum Z projection of 5 planes (15 fps; 2 min acquisition). We checked by immunofluorescence that cells expressing GFP-MICAL-L1 also express myc-PACSIN3 (not shown)

3) EHD3, un autre partenaire de MICAL-L1 dans le recyclage membranaire

MICAL-L1 a de nombreux partenaires, dont les protéines EHDs. Cette famille de protéines a déjà été décrite comme impliquée dans des événements de recyclage membranaire, notamment la protéine EHD1. EHD1 est capable de former des hétérodimères avec EHD3. Le couple MICAL-L1/EHD1 a été bien caractérisé dans la littérature ; cependant, aucune étude ne s'est vraiment intéressée au couple MICAL-L1/EHD3 et à son implication dans le recyclage membranaire. C'est pourquoi, en parallèle de mon étude sur MICAL-L1/PACSINE3, j'ai réalisé des travaux portant sur MICAL-L1 et EHD3. Cette étude est encore en cours de réalisation ; elle devrait être publiée prochainement. Dans la partie qui va suivre seront présentés les résultats obtenus.

a) Caractérisation de l'interaction MICAL-L1/EHD3

Les résultats du double hybride, qui ont permis d'identifier PACSINE3 comme partenaire de MICAL-L1, ont également révélé la protéine EHD3 comme partenaire de MICAL-L1 (données non présentées). Les protéines EHDs interagissent avec les motifs NPF contenus dans la séquence de leurs partenaires. La protéine MICAL-L1, à la différence de MICAL-L2, possède deux motifs NPF, NPF1 et NPF2, susceptibles d'interagir avec les protéines EHDs (Figure 1A). Il a déjà été montré que MICAL-L1 interagit avec EHD1 par l'intermédiaire de son domaine NPF1 (Sharma et al., 2009). Des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées avec des cellules HeLa surexprimant de façon transitoire GFP-MICAL-L1 sauvage et myc-EHD3. Elles confirment que MICAL-L1 interagit aussi avec EHD3. Pour déterminer le domaine impliqué dans l'interaction entre les deux protéines, myc-EHD3 a également été coexprimée avec des formes mutantes Δ NPF1, Δ NPF2, Δ NPF1+2 de GFP-MICAL-L1 (Figure 9A et B).

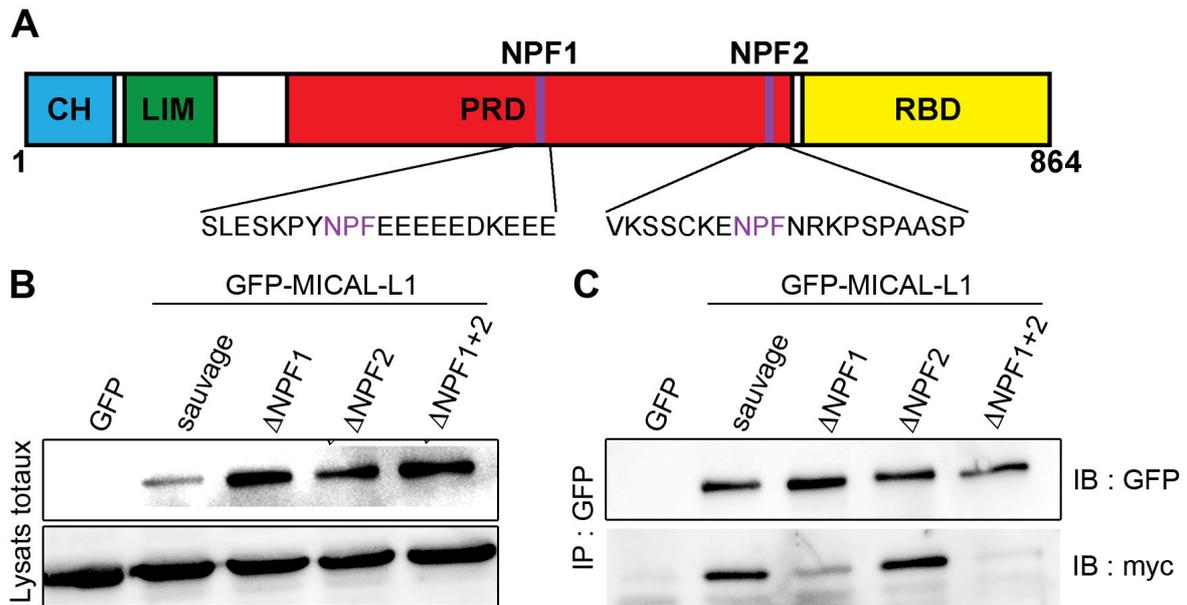


Figure 70 : Le motif NPF1 de MICAL-L1 est nécessaire à l'interaction avec EHD3.

(A) Organisation schématique de la protéine MICAL-L1. CH : calponin homology, LIM : Lin-11, Isl-1, Mec-3, PRD : proline rich domain, RBD : Rab binding domain, les positions des motifs NPF1 et NPF2 sont indiquées. (B) Des lysats de cellules HeLa coexprimant de façon transitoire la GFP seule, GFP-MICAL-L1 sauvage, Δ NPF1, Δ NPF2 ou Δ NPF1+2 et myc-EHD3 ont été incubés avec un anti-GFP. (C) Le matériel co-immunoprécipité est révélé avec des anticorps anti-GFP et anti-myc.

Toutes les constructions s'expriment dans les cellules. Lorsque GFP-MICAL-L1 est immunoprécipitée avec un anticorps anti-GFP, myc-EHD co-immunoprécipite. Myc-EHD ne co-immunoprécipite avec la GFP seule. L'interaction MICAL-L1/EHD3 est aussi observée quand myc-EHD3 et le mutant GFP-MICAL-L1 Δ NPF2 sont exprimés. En revanche l'absence du motif NPF1 diminue drastiquement l'interaction entre MICAL-L1 et EHD3. L'interaction est totalement abolie si les motifs NPF 1 et 2 sont mutés (Figure 9C). Ces résultats, en plus de permettre de confirmer l'interaction de MICAL-L1 et EHD3, indiquent que le motif NPF1 de MICAL-L1 est requis pour l'interaction, tandis que le motif NPF2 pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'interaction.

b) MICAL-L1 et EHD3 colocalisent dans des structures tubulaires.

Après avoir confirmé l'interaction de MICAL-L1 avec EHD3, et l'importance du motif NPF1 dans cette interaction, nous avons observé la localisation intracellulaire des deux protéines. Des cellules HeLa ont été cotransfectées avec myc-EHD3 et GFP-MICAL-L1 ou la GFP seule comme contrôle. EHD3 est retrouvée au niveau de

tubules dans la cellule. Lorsque MICAL-L1 est coexprimée, EHD3 colocalise très fortement avec MICAL-L1 (coefficient de Pearson = $0,83 \pm 0,03$) (Figure 10A et B). De plus, comparée à l'expression de MICAL-L1 seule, la coexpression d'EHD3 augmente le nombre de tubules ainsi que le nombre de tubules $>2,6 \mu\text{m}$ de façon très significative. Ces résultats mettent en avant un rôle de la protéine EHD3 dans la formation et l'élongation des tubules où est recrutée MICAL-L1.

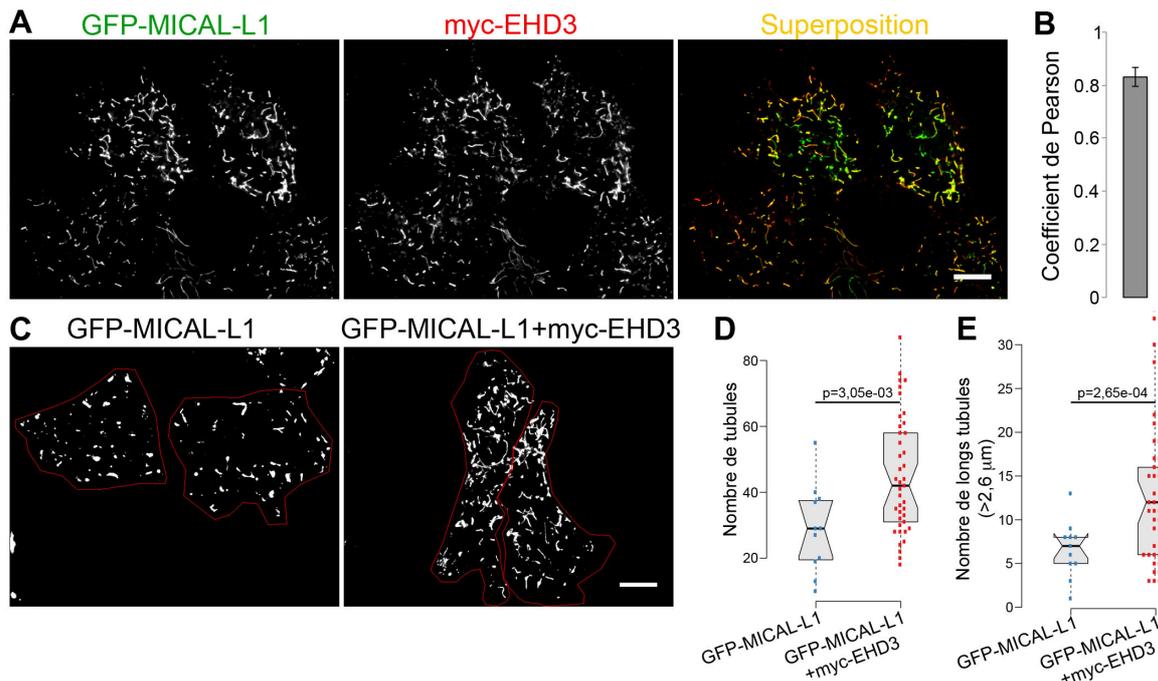


Figure 71 : EHD3 colocalise avec MICAL-L1 et stimule la formation de tubules.

(A) Des cellules coexprimant de façon transitoire GFP-MICAL-L1 et myc-EHD3 sont fixées, perméabilisées puis immunomarquées avec un anticorps anti-myc et analysées par microscopie à champs large. Une pile d'image en trois dimensions est acquise et déconvoluée. Les projections de chaque canal (vert et rouge) sont combinées en une seule image, présentée dans la troisième colonne (superposition). La colocalisation des deux protéines est révélée par la couleur jaune. Barre d'échelle $10 \mu\text{m}$. (B) Quantification de la colocalisation de GFP-MICAL-L1 et myc-EHD3 à l'aide du coefficient de Pearson ($n=30$ cellules). (C) Des cellules HeLa coexprimant de façon transitoire GFP-MICAL-L1 et myc seul ou myc-EHD3 sont fixées, perméabilisées puis immunomarquées avec un anticorps anti-myc et analysées par microscopie à champs large. Une pile d'images en trois dimensions est acquise et déconvoluée. Les projections du canal de la GFP sont présentées. Barre d'échelle $10 \mu\text{m}$. (D) Quantification du nombre de tubules et (E) du nombre de tubules $>2,6 \mu\text{m}$ dans des cellules exprimant GFP-MICAL-L1 ($n=11$ cellules) seul ou coexprimant GFP-MICAL-L1 et myc-EHD3 ($n=41$ cellules). Les valeurs p sont indiquées.

c) Le domaine NPF2 de MICAL-L1 est important pour la fission des tubules

Les protéines EHDs sont des ATPases jouant un rôle dans la formation de tubule et dans la fission de vésicules de transport. Nous avons voulu quantifier le nombre de tubules induits par l'expression de MICAL-L1 sauvage, comparée aux mutants Δ NPF1, Δ NPF2 et MPBM (mutant ne pouvant pas interagir avec les PACSINES 2 et 3). Surexprimée de façon transitoire, la protéine MICAL-L1 présente une distribution vésiculo-tubulaire. La même distribution est observée pour les mutants de MICAL-L1 Δ NPF1 et MPBM. En revanche, l'expression du mutant MICAL-L1 Δ NPF2 induit la formation des tubules plus longs, comparés à ceux formés dans les autres cellules (Figure 11A).

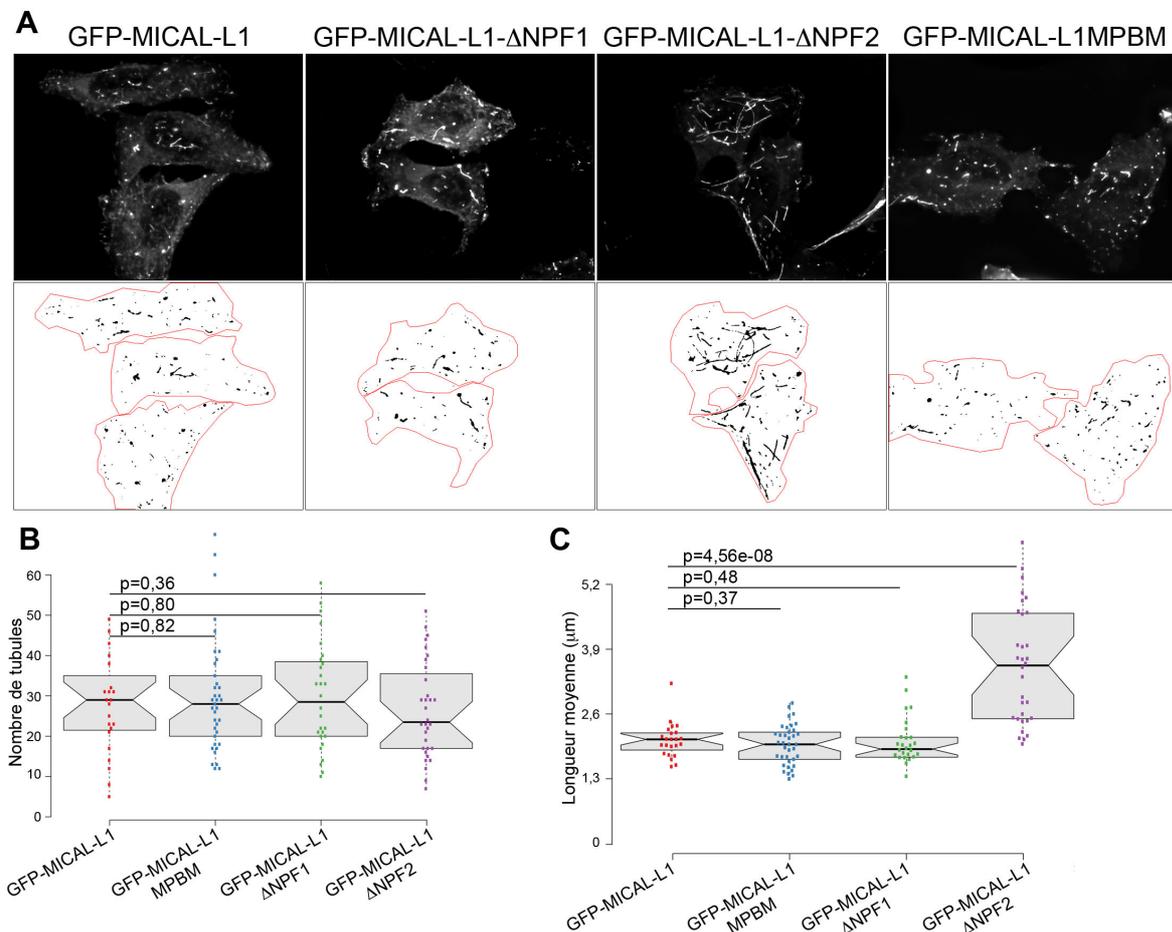


Figure 72 : L'absence du motif NPF2 de MICAL-L1 génère la formation de longs tubules.

(A) Des cellules HeLa exprimant de façon transitoire GFP-MICAL-L1 sauvage, Δ NPF1, Δ NPF2 ou Δ NPF1+2 sont fixées et analysées par microscopie à champs large. Une pile d'images en trois dimensions est acquise et déconvoluée. Les projections du canal de la GFP sont présentées ainsi qu'un masque du marquage avec le contour de chaque cellule. Barre d'échelle 10 μ m. (B-C) Quantification du (B) nombre de tubules et de la (C) longueur

moyenne des tubules contenant GFP-MICAL-L1 sauvage ou mutée. Les valeurs p, indiquées dans chaque condition, sont comparées à GFP-MICAL-L1 sauvage.

Pour mieux apprécier ces observations, les tubules ont été quantifiés et leur longueur déterminée. Dans toutes les conditions, le nombre de tubules par cellules est le même. En revanche, le mutant Δ NPF2 présente une augmentation très significative de la longueur moyenne des tubules, comparé à toutes les autres conditions qui ne présentent pas, elles, de variations majeures (Figure 11B-C). Ces résultats mettent en avant un rôle du motif NPF2. Bien qu'il ne soit pas impliqué dans l'interaction avec EHD3, NPF2 participe à la fission des tubules ou du moins, permet de contrôler leur longueur.

d) L'interaction de MICAL-L1 avec les EHDs régule le recyclage du TfR

Les tubules formés par MICAL-L1 sont impliqués dans le recyclage du TfR-pHluorine. L'influence des différents partenaires de MICAL-L1 sur la genèse des tubules peut moduler ce recyclage. Nous avons *supra* que la PACSINE3, effecteur de MICAL-L1, peut stimuler le recyclage du TfR. Les cellules HeLa ont été cotransfectés avec le TfR-pHluorine, ainsi que mCherry-MICAL-L1 sauvage ou ses mutants Δ NPF 1, 2 ou 1+2. Le nombre d'événements d'exocytose du TfR-pHluorine a été quantifié dans les différentes conditions (Figure 12).

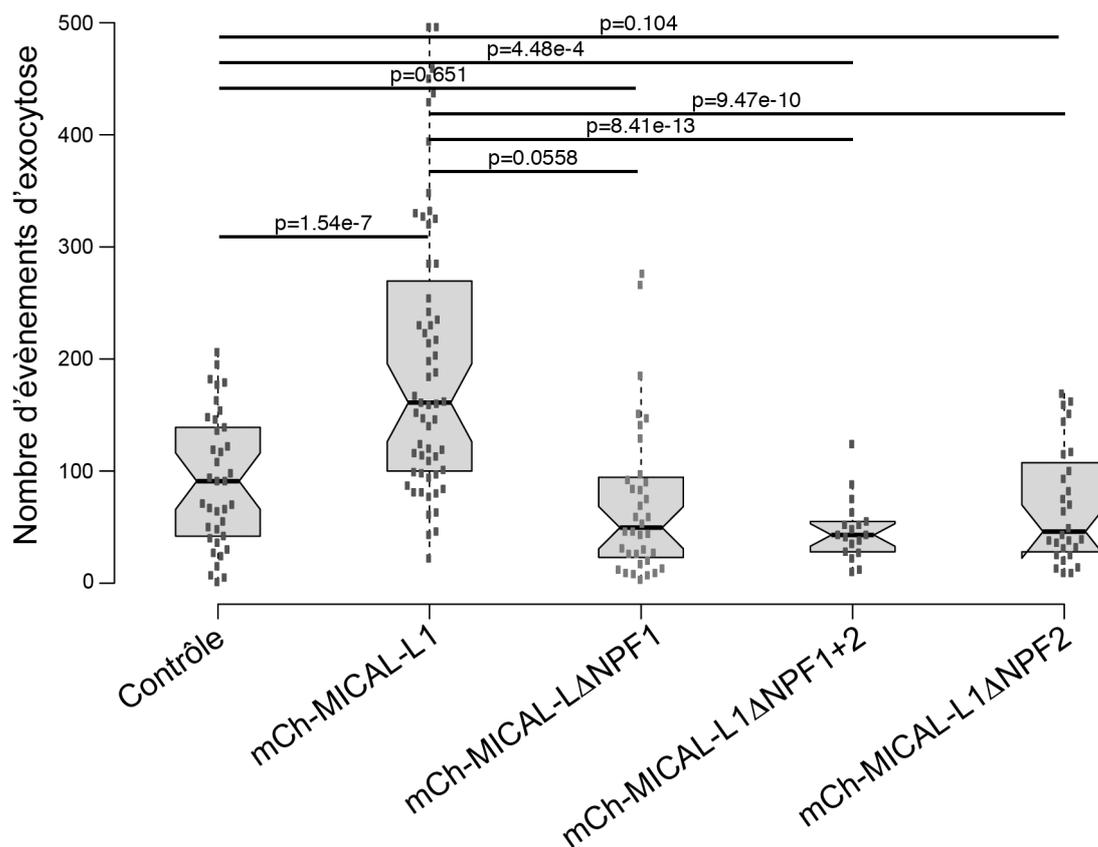


Figure 73 : Les deux motifs NPF de MICAL-L1 sont importants pour le recyclage du TfR.

Quantification du nombre d'événements d'exocytose du TfR-pHI de cellules HeLa coexprimant de façon transitoire le TfR-pHI et mCherry seule (n=37 cellules), mCherry-MICAL-L1 sauvage (n=59 cellules), Δ NPF1 (n=36 cellules), Δ NPF1+2 (n=18 cellules) ou Δ NPF2 (n=28 cellules). Les valeurs p, indiquées pour chaque condition, sont comparées au contrôle et à mCherry-MICAL-L1 sauvage.

Les cellules surexprimant de façon transitoire mCherry-MICAL-L1 présentent une augmentation du nombre d'événements d'exocytose du TfR-pHI. En revanche, dans les cellules surexprimant les mutants mCherry-MICAL-L1- Δ NPF 1, 2 ou 1+2, le nombre d'événements d'exocytose est inférieur à celui des cellules contrôles, suggérant une inhibition du recyclage. L'interaction de MICAL-L1 avec les protéines EHDs est donc nécessaire pour le recyclage du TfR. Les mutants Δ NPF1 et 1+2, incapables d'interagir avec EHD3, inhibent le recyclage. De façon surprenante, le mutant Δ NPF2, qui n'est pas impliqué dans l'interaction avec EHD, inhibe aussi le recyclage du TfR.

**DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de thèse, j'ai décrit de nouvelles interactions protéiques. Celle entre MICAL-L1 et la protéine à domaine F-BAR PACSINE3 et celle entre MICAL-L1 et la protéine à domaine « dynamine-like » EHD3. Les résultats démontrent que l'interaction avec la PACSINE3 requière 2 motifs, PLPP et PRAP, contenus dans le domaine riche en proline (PRD) de MICAL-L1 et le domaine SH3 de la PACSINE3. MICAL-L1 contient également 2 motifs NPF, capables d'interagir avec les protéines EHDs. J'ai démontré que le motif NPF1 de MICAL-L1 est nécessaire à l'interaction avec EHD3. Mes travaux ont mis en avant l'importance du complexe MICAL-L1/PACSINE3 dans la formation et l'élongation de tubules de compartiments de recyclage facilitant le transport du TfR à la membrane plasmique. De façon intéressante, j'ai pu démontrer que la PACSINE3, en plus de son rôle dans l'inhibition de l'internalisation de la Tf (Modregger et al., 2000), est également impliquée dans le recyclage. De plus, l'inhibition de l'interaction de MICAL-L1 avec EHD 1 et 3 abolit complètement le recyclage vers la membrane plasmique. Enfin, MICAL-L1 est retrouvée associée aux Rabs 8, 11, 13 et 35, impliquées dans la voie de recyclage lent, mais pas avec Rab4, associée à la voie de recyclage rapide. Ceci suggère donc que MICAL-L1 et ses effecteurs sont impliqués dans la voie de recyclage lent. En conclusion, mes travaux de thèse ont permis de mettre en lumière les interactions de MICAL-L1/PACSINE3 et MICAL-L1/EHD3 et l'importance de ces complexes dans la régulation du recyclage du TfR vers la membrane plasmique.

1) MICAL-L1/PACSINES/EHDs : de nouveaux complexes impliqués dans le recyclage

Une étude précédente, a mis en évidence un autre complexe, composé de MICAL-L1 et PACSINE2 (Giridharan et al., 2013). Dans ces travaux, MICAL-L1, PACSINE2 et la protéine EHD1 forme un « ménage à trois », permettant de générer un réseau vésiculo-tubulaire au niveau des compartiments de recyclage. L'interaction de MICAL-L1 avec le domaine SH3 de PACSINE 2 et 3 implique les mêmes motifs, PLPP et PRAP de MICAL-L1. Dans l'étude du Dr Steve Caplan, l'extinction de la PACSINE2 délocalise MICAL-L1 qui n'est plus associée aux structures tubulaires. De même, l'extinction de l'expression de la PACSINE2 provoque la redistribution de

MICAL-L1, suggérant que la localisation de MICAL-L1 et PACSINE2 sont interdépendantes. Nos études montrent que l'extinction de la PACSINE3 n'a pas d'effet sur la localisation de MICAL-L1. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer la distribution de la PACSINE3 endogène, car les anticorps commerciaux anti-PACSINE3 ne marchent pas dans les expériences d'immunofluorescence. En revanche, nous avons montré que la coexpression de MICAL-L1 et de la PACSINE3 augmente le nombre et la longueur des tubules, formés par MICAL-L1. Il est à noter que la PACSINE2 possède des motifs NPFs qui lui permettent, indépendamment de MICAL-L1, d'interagir avec EHD1 et peut être avec EHD 2, 3 et 4. Les protéines EHDs, pourraient faciliter la formation de tubules membranaires ou même intervenir dans la scission des structures tubulaires. La PACSINE3, ne possède pas de motifs NPFs et ne pourrait former des complexes avec les EHDs que par l'intermédiaire de MICAL-L1. Le rôle des PACSINEs dans le recyclage vers la membrane plasmique peut résulter, au moins en partie, de leurs interactions avec MICAL-L1 et/ou EHDs. Ces informations mettent en évidence l'implication de la protéine MICAL-L1 dans différents complexes de recyclage, d'une part, un complexe faisant intervenir la protéine PACSINE2 liée, ou non, avec les EHDs ; d'autre part, un autre complexe mettant directement en jeu la protéine PACSINE3. Ces deux complexes sont préférentiellement retrouvés au niveau des domaines membranaires enrichis en acide phosphatidique qui joue également un rôle dans le recyclage du récepteur à la transferrine (Giridharan et al., 2013)

L'acide phosphatidique, et plus généralement les lipides, ont la capacité de recruter des protéines et peuvent de cette façon moduler, spatio-temporellement, la composition des membranes. Il a été impliqué dans plusieurs événements de recyclage (CMH-I, vésicules synaptiques) ou d'exocytose (Hatton et al., 2015; Jovanovic et al., 2006; Pelletan et al., 2015; Tu-Sekine et al., 2015; Xie et al., 2014). L'acide phosphatidique est présent en très faible quantité dans la cellule, cependant c'est le seul glycérophospholipide possédant 1 ou 2 charges négatives. Cette propriété unique de l'acide phosphatidique permet le recrutement de protéines chargées positivement (Ammar et al., 2014).

J'ai également montré que MICAL-L1 peut lier la phosphatidylsérine. Cette liaison pourrait être plus complexe que celle avec l'acide phosphatidique. En effet, certaines protéines ne sont capables de lier la phosphatidylsérine qu'à partir d'une certaine concentration et avec des conditions de courbures membranaires spécifiques (Lee et

al., 2015). Très récemment, il a été démontré que les fonctions d'EHD1 dans le recyclage, sont dépendantes de son recrutement par une phosphatidylsérine translocase. Cette enzyme, en favorisant l'exposition de la phosphatidylsérine au niveau du feuillet externe des endosomes de recyclage, permet un recrutement efficace d'EHD1, ce qui favorise une fission optimale des vésicules contenant de la transferrine. EHD1 peut aussi interagir avec le PI(4)P et le PI(4,5)P₂ (Jovic et al., 2009; Lee et al., 2015).

Au niveau fonctionnel, nous avons démontré que l'utilisation d'un mutant incapable d'interagir avec les PACSINE 2 et 3 stimule le recyclage du TfR. Il est possible que l'inhibition de l'interaction MICAL-L1/PACSINES, favorise l'interaction de MICAL-L1 avec d'autres partenaires comme les protéines EHDs, ou autres qui peuvent compenser l'effet des PACSINES. Une autre explication est que MICAL-L1 forme des homodimères (entre forme mutante et sauvage) permettant le recrutement minimal des PACSINES et donc le maintien du recyclage. En effet, la production du mutant MPBM dans les cellules, dont l'expression de MICAL-L1 endogène est éteinte, provoque une diminution significative du nombre et de la longueur des tubules contenant MICAL-L1. L'interaction MICAL-L1/PACSINE est donc nécessaire à la formation et à l'élongation des tubules membranaires, aidé ou non des protéines EHDs, selon le cas de figure.

2) Les tubules membranaires seraient le site de tri/recyclage

Les structures tubulo-vésiculaires que forment MICAL-L1 et PACSINE3, et de façon plus générale, les protéines à domaine BAR, sont régulées par des événements de nucléation, d'élongation et de fission membranaires. La capacité de tubulation de certaines protéines comme les PACSINES a été testé *in vitro*. Toutes les PACSINES induisent la tubulation de liposomes. La PACSINE3 forme des tubules dont le diamètre est d'environ 100 nm, ce qui n'est pas le cas des PACSINE 1 et 2, dont le diamètres des tubules varie entre 0 et 200 nm (Bai et al., 2012). La détermination des paramètres précis des tubules (longueur, diamètre...) de MICAL-L1, en présence ou en absence de la PACSINE3, pourrait apporter de nouvelles informations sur la corégulation, par ces protéines, des tubules membranaires impliqués dans le recyclage vers la membrane plasmique. Des expériences *in vitro*, basées sur l'utilisation de GUVs (Giant unilamellar vesicles) et de protéines purifiées

fluorescentes, sont en cours en collaboration avec le laboratoire du Dr. Patricia Bassereau (Institut Curie). Le but est de comprendre la contribution de MICAL-L1 et PACSINE3, ainsi que la séquence d'événements, dans la genèse des tubules à partir de liposomes.

Nos expériences de coexpression ou d'extinction des protéines MICAL-L1/PACSINE3 révèlent que les 2 protéines coopèrent pour générer des tubules membranaires dans la cellule. La vidéomicroscopie confocale montre que le réseau tubulo-vésiculaire est dynamique et qu'il contient la transferrine fluorescente. De plus, on constate que les cargos de transferrine ségrégent et se détachent à partir des tubules, suggérant que ces tubules MICAL-L1/PACSINE3 participent au tri des vésicules adressées à la membrane plasmique.

3) Importance des domaines NPFs de MICAL-L1

Nous avons vu que MICAL-L1 a de nombreux partenaires, capables de moduler l'adressage de cargos à la membrane plasmique. Le couple MICAL-L1/EHD1 a déjà été identifié comme impliqué dans le recyclage des intégrines, l'adhérence cellulaire et la formation des neurites (Kobayashi et al., 2014a; Reinecke et al., 2014; Sharma et al., 2009). En revanche, plusieurs études ont été faites sur EHD3, mais peu d'études se sont intéressées précisément au couple MICAL-L1/EHD3. Mes travaux ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les capacités d'EHD3 à augmenter le nombre et la longueur de tubules contenant MICAL-L1.

Il serait intéressant de tester l'implication d'EHD3 dans le recyclage du TfR-pHI, par TIRFM, soit dans des cellules exprimant de façon transitoire la protéine EHD3 fusionnée à mCherry, soit dans des cellules où l'expression de EHD3 est inhibée par ARN interférence. Ainsi, il sera possible de définir le rôle de MICAL-L1 et EHD3 dans la régulation du recyclage vers la surface cellulaire.

Le motif NPF1 de MICAL-L1 est responsable de l'interaction avec EHD1 (Sharma et al., 2009) et EHD3. Cependant la protéine MICAL-L1 possède un second motif NPF2, qui n'est pas impliqué dans l'interaction avec les protéines EHDs. En effet, l'expression dans les cellules HeLa, du mutant GFP-MICAL-L1 Δ NPF2 n'inhibe pas l'interaction avec EHD3. En revanche, l'expression du mutant Δ NPF1+2, abolit totalement l'interaction avec EHD3. De plus, nous avons démontré que la

surexpression de GFP-MICAL-1 mutantes, Δ NPF1 et Δ NPF1+2, ne modifie, ni le nombre de tubules, ni leur longueur. En revanche, et de façon surprenante, la surexpression de GFP-MICAL-L1 Δ NPF2, augmente très fortement la longueur des tubules contenant MICAL-L1, sans toutefois modifier leur nombre. Ces résultats révèlent un nouveau rôle du motif NPF2 de MICAL-L1 dans la genèse/fission des tubules. Il serait alors intéressant d'identifier les partenaires de ce domaine, car jusqu'ici, les études publiées mettent en évidence des partenaires du motif NPF1, mais pas ceux du NPF2. Le motif NPF2 pourrait réguler finement l'interaction de MICAL-L1 avec les protéines EHD 1 et 3. Il pourrait également avoir des partenaires permettant d'augmenter la tension membranaire, tels que des régulateurs de la polymérisation d'actine ou des moteurs moléculaires, qui faciliteraient ensuite la fission des tubules.

4) EHDs, modification post-traductionnelles

Les protéines EHDs présentent une large expression dans différents tissus humains. Tous les tissus expriment les 4 EHDs, avec des niveaux plus ou moins forts et certaines protéines EHDs peuvent interagir entre elles. De plus dans les cellules de mammifère, les EHDs présentent des distributions spécifiques, avec des chevauchements ; EHD1 colocalise partiellement, avec EHD 3 et 4 ; EHD2 avec EHD4 ; EHD3 avec EHD 1 et 4 ; EHD4 avec EHD 1,2 et 3. De plus, EHD 1, 3 et 4 sont majoritairement associées à des compartiments de recyclage (Rab11 positifs) (George et al., 2007).

Toutes ces interactions établissent un large réseau de connections entre les EHDs et leur partenaires, leur permettant ainsi de réguler de nombreux événements de transport intracellulaire. Il a déjà été démontré qu'EHD 1 et 4 sont impliquées dans l'endocytose de la molécule d'adhésion NgCAM dans les neurones (mais pas EHD3) (Yap et al., 2010), Récemment, EHD1 et EHD3 ont été identifiées comme protéines clé de l'assemblage du cil primaire (Lu et al., 2015). Les EHDs peuvent être phosphorylées sur des résidus sérines. Cependant, seule EHD1 présente une augmentation de son niveau de phosphorylation en présence de sérum, ainsi qu'après stimulation de l'endocytose clathrine-dépendante. Il serait donc intéressant de connaître le rôle des sites de phosphorylation des autres protéines EHDs, et si la

phosphorylation peut moduler leur localisation intracellulaire, ou leur réseau d'interactions, comme, par exemple, avec MICAL-L1 et la PACSINE3.

5) Conclusion générale

Les travaux réalisés au cours de ma thèse et d'autres issus de différents laboratoires, impliquent MICAL-L1 dans des événements de tri et d'adressage vers la membrane plasmique. Les domaines PRD et RBD, ainsi que les motifs NPF, en font une protéine d'échafaudage complexe qui module le trafic membranaire. Les interactions directes de MICAL-L1 avec différentes Rabs impliquées dans la voie de recyclage, avec les protéines à domaine F-BAR, PACSINEs, et avec les protéines EHDs, permettent de modifier la structure tubulo-vésiculaire des compartiments de recyclage. Il serait intéressant d'identifier les protéines interagissant avec les domaines CH et LIM pour compléter le schéma du réseau d'interaction de MICAL-L1 et probablement établir le lien entre MICAL-L1 et la dynamique du cytosquelette d'actine requis pour le recyclage/exocytose.

La protéine MICAL-L1 coordonnerait, avec ses partenaires, Rabs, PACSINEs, EHDs, ..., l'organisation de microdomaines riches en acide phosphatidique requis pour le tri/adressage de protéines membranaires vers la surface cellulaire. Prises ensemble, ces connaissances font de la protéine MICAL-L1 et plus généralement des protéines de la famille MICAL, de nouveaux acteurs majeurs du trafic intracellulaire.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aberle, H. 2013. Redox switch for actin. *Nature cell biology*. 15:1403-1404.
- Abou-Zeid, N., R. Pandjaitan, L. Sengmanivong, V. David, G. Le Pavec, J. Salamero, and A. Zahraoui. 2011. MICAL-like1 mediates epidermal growth factor receptor endocytosis. *Molecular biology of the cell*. 22:3431-3441.
- Aguet, F., C.N. Antonescu, M. Mettlen, S.L. Schmid, and G. Danuser. 2013. Advances in analysis of low signal-to-noise images link dynamin and AP2 to the functions of an endocytic checkpoint. *Developmental cell*. 26:279-291.
- Ahle, S., A. Mann, U. Eichelsbacher, and E. Ungewickell. 1988. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *The EMBO journal*. 7:919-929.
- Allaire, P.D., A.L. Marat, C. Dall'Armi, G. Di Paolo, P.S. McPherson, and B. Ritter. 2010. The Connecdenn DENN domain: a GEF for Rab35 mediating cargo-specific exit from early endosomes. *Molecular cell*. 37:370-382.
- Allaire, P.D., M. Seyed Sadr, M. Chaineau, E. Seyed Sadr, S. Konefal, M. Fotouhi, D. Maret, B. Ritter, R.F. Del Maestro, and P.S. McPherson. 2013. Interplay between Rab35 and Arf6 controls cargo recycling to coordinate cell adhesion and migration. *Journal of cell science*. 126:722-731.
- Ammar, M.R., N. Kassas, M.F. Bader, and N. Vitale. 2014. Phosphatidic acid in neuronal development: a node for membrane and cytoskeleton rearrangements. *Biochimie*. 107 Pt A:51-57.
- Andersson, F., J. Jakobsson, P. Low, O. Shupliakov, and L. Brodin. 2008. Perturbation of syndapin/PACSIN impairs synaptic vesicle recycling evoked by intense stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:3925-3933.
- Ang, A.L., T. Taguchi, S. Francis, H. Folsch, L.J. Murrells, M. Pypaert, G. Warren, and I. Mellman. 2004. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *The Journal of cell biology*. 167:531-543.
- Anggono, V., Y. Koc-Schmitz, J. Widagdo, J. Kormann, A. Quan, C.M. Chen, P.J. Robinson, S.Y. Choi, D.J. Linden, M. Plomann, and R.L. Huganir. 2013. PICK1 interacts with PACSIN to regulate AMPA receptor internalization and cerebellar long-term depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:13976-13981.
- Antonescu, C.N., T.E. McGraw, and A. Klip. 2014. Reciprocal regulation of endocytosis and metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6:a016964.
- Apodaca, G., L.I. Gallo, and D.M. Bryant. 2012. Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry. *Nature cell biology*. 14:1235-1243.
- Arighi, C.N., L.M. Hartnell, R.C. Aguilar, C.R. Haft, and J.S. Bonifacino. 2004. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *The Journal of cell biology*. 165:123-133.
- Ashida, S., M. Furihata, T. Katagiri, K. Tamura, Y. Anazawa, H. Yoshioka, T. Miki, T. Fujioka, T. Shuin, Y. Nakamura, and H. Nakagawa. 2006. Expression of novel molecules, MICAL2-PV (MICAL2 prostate cancer variants), increases with high Gleason score and prostate cancer progression. *Clin Cancer Res*. 12:2767-2773.

- Babbey, C.M., N. Ahktar, E. Wang, C.C. Chen, B.D. Grant, and K.W. Dunn. 2006. Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*. 17:3156-3175.
- Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S.D. Emr. 2002a. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental cell*. 3:271-282.
- Babst, M., D.J. Katzmann, W.B. Snyder, B. Wendland, and S.D. Emr. 2002b. Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Developmental cell*. 3:283-289.
- Babuke, T., and R. Tikkanen. 2007. Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *Eur J Cell Biol*. 86:525-532.
- Bach, I. 2000. The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev*. 91:5-17.
- Bache, K.G., A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark. 2003. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *The Journal of cell biology*. 162:435-442.
- Bachhawat, A.K., J. Suhan, and E.W. Jones. 1994. The yeast homolog of H < beta > 58, a mouse gene essential for embryogenesis, performs a role in the delivery of proteins to the vacuole. *Genes Dev*. 8:1379-1387.
- Baetz, N.W., and J.R. Goldenring. 2013. Rab11-family interacting proteins define spatially and temporally distinct regions within the dynamic Rab11a-dependent recycling system. *Molecular biology of the cell*. 24:643-658.
- Bai, X., G. Meng, M. Luo, and X. Zheng. 2012. Rigidity of wedge loop in PACSIN 3 protein is a key factor in dictating diameters of tubules. *J Biol Chem*. 287:22387-22396.
- Balderhaar, H.J., and C. Ungermann. 2013. CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *Journal of cell science*. 126:1307-1316.
- Bantel-Schaal, U., I. Braspenning-Wesch, and J. Kartenbeck. 2009. Adeno-associated virus type 5 exploits two different entry pathways in human embryo fibroblasts. *J Gen Virol*. 90:317-322.
- Barr, F., and D.G. Lambright. 2010. Rab GEFs and GAPs. *Current opinion in cell biology*. 22:461-470.
- Barr, F.A., and B. Short. 2003. Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Current opinion in cell biology*. 15:405-413.
- Barral, D.C., M. Cavallari, P.J. McCormick, S. Garg, A.I. Magee, J.S. Bonifacino, G. De Libero, and M.B. Brenner. 2008. CD1a and MHC class I follow a similar endocytic recycling pathway. *Traffic*. 9:1446-1457.
- Basquin, C., V. Malarde, P. Mellor, D.H. Anderson, V. Meas-Yedid, J.C. Olivo-Marin, A. Dautry-Varsat, and N. Sauvonnnet. 2013. The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. *Journal of cell science*. 126:1099-1108.
- Benjamin, S., H. Weidberg, D. Rapaport, O. Pekar, M. Nudelman, D. Segal, K. Hirschberg, S. Katzav, M. Ehrlich, and M. Horowitz. 2011. EHD2 mediates trafficking from the plasma membrane by modulating Rac1 activity. *The Biochemical journal*. 439:433-442.
- Benmerah, A., J. Gagnon, B. Begue, B. Megarbane, A. Dautry-Varsat, and N. Cerf-Bensussan. 1995. The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2. *The Journal of cell biology*. 131:1831-1838.

- Beuchle, D., H. Schwarz, M. Langeegger, I. Koch, and H. Aberle. 2007. Drosophila MICAL regulates myofilament organization and synaptic structure. *Mech Dev.* 124:390-406.
- Bhuin, T., and J.K. Roy. 2015. Rab11 in disease progression. *Int J Mol Cell Med.* 4:1-8.
- Blondeau, F., B. Ritter, P.D. Allaire, S. Wasiak, M. Girard, N.K. Hussain, A. Angers, V. Legendre-Guillemain, L. Roy, D. Boismenu, R.E. Kearney, A.W. Bell, J.J. Bergeron, and P.S. McPherson. 2004. Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101:3833-3838.
- Blume, J.J., A. Halbach, D. Behrendt, M. Paulsson, and M. Plomann. 2007. EHD proteins are associated with tubular and vesicular compartments and interact with specific phospholipids. *Experimental cell research.* 313:219-231.
- Blumer, J., J. Rey, L. Dehmelt, T. Mazel, Y.W. Wu, P. Bastiaens, R.S. Goody, and A. Itzen. 2013. RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *The Journal of cell biology.* 200:287-300.
- Blumstein, J., V. Faundez, F. Nakatsu, T. Saito, H. Ohno, and R.B. Kelly. 2001. The neuronal form of adaptor protein-3 is required for synaptic vesicle formation from endosomes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 21:8034-8042.
- Boehm, M., R.C. Aguilar, and J.S. Bonifacino. 2001. Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *The EMBO journal.* 20:6265-6276.
- Bonifacino, J.S. 2014. Vesicular transport earns a Nobel. *Trends in cell biology.* 24:3-5.
- Bonifacino, J.S., and B.S. Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 116:153-166.
- Bonifacino, J.S., and J.H. Hurley. 2008. Retromer. *Current opinion in cell biology.* 20:427-436.
- Bonifacino, J.S., and R. Rojas. 2006. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 7:568-579.
- Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer. 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell.* 129:865-877.
- Botelho, R.J., and S. Grinstein. 2011. Phagocytosis. *Current biology : CB.* 21:R533-538.
- Boucrot, E., A.P. Ferreira, L. Almeida-Souza, S. Debard, Y. Vallis, G. Howard, L. Bertot, N. Sauvonnet, and H.T. McMahon. 2015. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature.* 517:460-465.
- Boucrot, E., M.T. Howes, T. Kirchhausen, and R.G. Parton. 2011. Redistribution of caveolae during mitosis. *Journal of cell science.* 124:1965-1972.
- Boucrot, E., and T. Kirchhausen. 2007. Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104:7939-7944.
- Boulanger, J., A. Gidon, C. Kervran, and J. Salamero. 2010a. A patch-based method for repetitive and transient event detection in fluorescence imaging. *PloS one.* 5:e13190.
- Boulanger, J., C. Kervrann, P. Bouthemy, P. Elbau, J.B. Sibarita, and J. Salamero. 2010b. Patch-based nonlocal functional for denoising fluorescence microscopy image sequences. *IEEE Trans Med Imaging.* 29:442-454.

- Braun, A., R. Pinyol, R. Dahlhaus, D. Koch, P. Fonarev, B.D. Grant, M.M. Kessels, and B. Qualmann. 2005. EHD proteins associate with syndapin I and II and such interactions play a crucial role in endosomal recycling. *Mol Biol Cell*. 16:3642-3658.
- Bron, R., M. Vermeren, N. Kokot, W. Andrews, G.E. Little, K.J. Mitchell, and J. Cohen. 2007. Boundary cap cells constrain spinal motor neuron somal migration at motor exit points by a semaphorin-plexin mechanism. *Neural Dev*. 2:21.
- Brown, F.D., A.L. Rozelle, H.L. Yin, T. Balla, and J.G. Donaldson. 2001. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *The Journal of cell biology*. 154:1007-1017.
- Brown, T.C., S.S. Correia, C.N. Petrok, and J.A. Esteban. 2007. Functional compartmentalization of endosomal trafficking for the synaptic delivery of AMPA receptors during long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:13311-13315.
- Bryant, D.M., M.C. Kerr, L.A. Hammond, S.R. Joseph, K.E. Mostov, R.D. Teasdale, and J.L. Stow. 2007. EGF induces macropinocytosis and SNX1-modulated recycling of E-cadherin. *Journal of cell science*. 120:1818-1828.
- Buccione, R., J.D. Orth, and M.A. McNiven. 2004. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5:647-657.
- Burd, C.G., T.I. Strochlic, and S.R. Gangi Setty. 2004. Arf-like GTPases: not so Arf-like after all. *Trends in cell biology*. 14:687-694.
- Burden, J.J., X.M. Sun, A.B. Garcia, and A.K. Soutar. 2004. Sorting motifs in the intracellular domain of the low density lipoprotein receptor interact with a novel domain of sorting nexin-17. *The Journal of biological chemistry*. 279:16237-16245.
- Burgener, R., M. Wolf, T. Ganz, and M. Baggiolini. 1990. Purification and characterization of a major phosphatidylserine-binding phosphoprotein from human platelets. *The Biochemical journal*. 269:729-734.
- Burkhard, P., J. Stetefeld, and S.V. Strelkov. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends in cell biology*. 11:82-88.
- Cabrera, M., and C. Ungermann. 2010. Guiding endosomal maturation. *Cell*. 141:404-406.
- Cai, B., S.S. Giridharan, J. Zhang, S. Saxena, K. Bahl, J.A. Schmidt, P.L. Sorgen, W. Guo, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2013. Differential roles of C-terminal Eps15 homology domain proteins as vesiculators and tubulators of recycling endosomes. *The Journal of biological chemistry*. 288:30172-30180.
- Canuel, M., S. Lefrancois, J. Zeng, and C.R. Morales. 2008. AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 366:724-730.
- Caplan, S., N. Naslavsky, L.M. Hartnell, R. Lodge, R.S. Polishchuk, J.G. Donaldson, and J.S. Bonifacino. 2002. A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *The EMBO journal*. 21:2557-2567.
- Caswell, P.T., and J.C. Norman. 2006. Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic*. 7:14-21.
- Chadda, R., M.T. Howes, S.J. Plowman, J.F. Hancock, R.G. Parton, and S. Mayor. 2007. Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. *Traffic*. 8:702-717.

- Chavrier, P., R.G. Parton, H.P. Hauri, K. Simons, and M. Zerial. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*. 62:317-329.
- Chen, C.C., P.J. Schweinsberg, S. Vashist, D.P. Mareiniss, E.J. Lambie, and B.D. Grant. 2006. RAB-10 is required for endocytic recycling in the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Molecular biology of the cell*. 17:1286-1297.
- Chen, C.Y., and F.M. Brodsky. 2005. Huntingtin-interacting protein 1 (Hip1) and Hip1-related protein (Hip1R) bind the conserved sequence of clathrin light chains and thereby influence clathrin assembly in vitro and actin distribution in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 280:6109-6117.
- Chen, C.Y., M.L. Reese, P.K. Hwang, N. Ota, D. Agard, and F.M. Brodsky. 2002. Clathrin light and heavy chain interface: alpha-helix binding superhelix loops via critical tryptophans. *The EMBO journal*. 21:6072-6082.
- Chen, E.H., B.A. Pryce, J.A. Tzeng, G.A. Gonzalez, and E.N. Olson. 2003. Control of myoblast fusion by a guanine nucleotide exchange factor, loner, and its effector ARF6. *Cell*. 114:751-762.
- Chen, H., S. Fre, V.I. Slepnev, M.R. Capua, K. Takei, M.H. Butler, P.P. Di Fiore, and P. De Camilli. 1998. Epsin is an EH-domain-binding protein implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature*. 394:793-797.
- Chen, Y.A., and R.H. Scheller. 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:98-106.
- Cherfils, J., and M. Zeghouf. 2013. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews*. 93:269-309.
- Chesneau, L., D. Dambournet, M. Machicoane, I. Kouranti, M. Fukuda, B. Goud, and A. Echard. 2012. An ARF6/Rab35 GTPase cascade for endocytic recycling and successful cytokinesis. *Current biology : CB*. 22:147-153.
- Chi, Y., M. Welcker, A.A. Hizli, J.J. Posakony, R. Aebersold, and B.E. Clurman. 2008. Identification of CDK2 substrates in human cell lysates. *Genome Biol*. 9:R149.
- Christoforidis, S., M. Miaczynska, K. Ashman, M. Wilm, L. Zhao, S.C. Yip, M.D. Waterfield, J.M. Backer, and M. Zerial. 1999. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nature cell biology*. 1:249-252.
- Chung, H.J., W.P. Ge, X. Qian, O. Wiser, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 2009. G protein-activated inwardly rectifying potassium channels mediate depotentiation of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:635-640.
- Chung, Y.C., W.C. Wei, S.H. Huang, C.M. Shih, C.P. Hsu, K.J. Chang, and W.T. Chao. 2014. Rab11 regulates E-cadherin expression and induces cell transformation in colorectal carcinoma. *BMC Cancer*. 14:587.
- Clarke, P.R., and C. Zhang. 2008. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:464-477.
- Cocucci, E., F. Aguet, S. Boulant, and T. Kirchhausen. 2012. The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*. 150:495-507.
- Collins, B.M., A.J. McCoy, H.M. Kent, P.R. Evans, and D.J. Owen. 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell*. 109:523-535.
- Coon, B.G., D.M. Drenzo, S.F. Konieczny, and R.C. Aguilar. 2011. Epsins' novel role in cancer cell invasion. *Communicative & integrative biology*. 4:95-97.
- Cormont, M., I. Meton, M. Mari, P. Monzo, F. Keslair, C. Gaskin, T.E. McGraw, and Y. Le Marchand-Brustel. 2003. CD2AP/CMS regulates endosome morphology

- and traffic to the degradative pathway through its interaction with Rab4 and c-Cbl. *Traffic*. 4:97-112.
- Cramm-Behrens, C.I., M. Dienst, and R. Jacob. 2008. Apical cargo traverses endosomal compartments on the passage to the cell surface. *Traffic*. 9:2206-2220.
- Cresawn, K.O., B.A. Potter, A. Oztan, C.J. Guerriero, G. Ihrke, J.R. Goldenring, G. Apodaca, and O.A. Weisz. 2007. Differential involvement of endocytic compartments in the biosynthetic traffic of apical proteins. *The EMBO journal*. 26:3737-3748.
- Crowther, R.A., and B.M. Pearse. 1981. Assembly and packing of clathrin into coats. *The Journal of cell biology*. 91:790-797.
- Cuajungco, M.P., C. Grimm, K. Oshima, D. D'Hoedt, B. Nilius, A.R. Mensenkamp, R.J. Bindels, M. Plomann, and S. Heller. 2006. PACSINs bind to the TRPV4 cation channel. PACSIN 3 modulates the subcellular localization of TRPV4. *J Biol Chem*. 281:18753-18762.
- Cullen, P.J. 2008. Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:574-582.
- Cullen, P.J., and H.C. Korswagen. 2012. Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nature cell biology*. 14:29-37.
- D'Hoedt, D., G. Owsianik, J. Prenen, M.P. Cuajungco, C. Grimm, S. Heller, T. Voets, and B. Nilius. 2008. Stimulus-specific modulation of the cation channel TRPV4 by PACSIN 3. *J Biol Chem*. 283:6272-6280.
- D'Souza-Schorey, C., and P. Chavrier. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7:347-358.
- Dambournet, D., M. Machicoane, L. Chesneau, M. Sachse, M. Rocancourt, A. El Marjou, E. Formstecher, R. Salomon, B. Goud, and A. Echard. 2011. Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nature cell biology*. 13:981-988.
- Daumke, O., R. Lundmark, Y. Vallis, S. Martens, P.J. Butler, and H.T. McMahon. 2007. Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. *Nature*. 449:923-927.
- Dawid, I.B., J.J. Breen, and R. Toyama. 1998. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet*. 14:156-162.
- De Franceschi, N., H. Hamidi, J. Alanko, P. Sahgal, and J. Ivaska. 2015. Integrin traffic - the update. *Journal of cell science*. 128:839-852.
- de Heuvel, E., A.W. Bell, A.R. Ramjaun, K. Wong, W.S. Sossin, and P.S. McPherson. 1997. Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. *The Journal of biological chemistry*. 272:8710-8716.
- de Madrid, B.H., L. Greenberg, and V. Hatini. 2015. RhoGAP68F controls transport of adhesion proteins in Rab4 endosomes to modulate epithelial morphogenesis of *Drosophila* leg discs. *Dev Biol*. 399:283-295.
- Delevoeye, C., S. Miserey-Lenkei, G. Montagnac, F. Gilles-Marsens, P. Paul-Gilloteaux, F. Giordano, F. Waharte, M.S. Marks, B. Goud, and G. Raposo. 2014. Recycling endosome tubule morphogenesis from sorting endosomes requires the kinesin motor KIF13A. *Cell reports*. 6:445-454.
- Dell'Angelica, E.C., J. Klumperman, W. Stoorvogel, and J.S. Bonifacino. 1998. Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science*. 280:431-434.

- Dell'Angelica, E.C., C. Mullins, and J.S. Bonifacino. 1999. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *The Journal of biological chemistry*. 274:7278-7285.
- Delprato, A., E. Merithew, and D.G. Lambright. 2004. Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell*. 118:607-617.
- Deneka, M., M. Neeft, I. Popa, M. van Oort, H. Sprong, V. Oorschot, J. Klumperman, P. Schu, and P. van der Sluijs. 2003. Rabaptin-5alpha/rabaptin-4 serves as a linker between rab4 and gamma(1)-adaptin in membrane recycling from endosomes. *The EMBO journal*. 22:2645-2657.
- Derivery, E., C. Sousa, J.J. Gautier, B. Lombard, D. Loew, and A. Gautreau. 2009. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Developmental cell*. 17:712-723.
- Derkach, V.A., M.C. Oh, E.S. Guire, and T.R. Soderling. 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 8:101-113.
- Dirac-Svejstrup, A.B., T. Sumizawa, and S.R. Pfeffer. 1997. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *The EMBO journal*. 16:465-472.
- Doherty, G.J., and H.T. McMahon. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*. 78:857-902.
- Doherty, K.R., A.R. Demonbreun, G.Q. Wallace, A. Cave, A.D. Posey, K. Heretis, P. Pytel, and E.M. McNally. 2008. The endocytic recycling protein EHD2 interacts with myoferlin to regulate myoblast fusion. *The Journal of biological chemistry*. 283:20252-20260.
- Donoso, M., J. Cancino, J. Lee, P. van Kerkhof, C. Retamal, G. Bu, A. Gonzalez, A. Caceres, and M.P. Marzolo. 2009. Polarized traffic of LRP1 involves AP1B and SNX17 operating on Y-dependent sorting motifs in different pathways. *Molecular biology of the cell*. 20:481-497.
- Duncan, M.C., G. Costaguta, and G.S. Payne. 2003. Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a gamma-adaptin ear-binding motif. *Nature cell biology*. 5:77-81.
- Echard, A., and V. Haucke. 2015. Lipids, GTPases, and their regulators in membrane dynamics: an intracellular menage a trois. *Molecular biology of the cell*. 26:1012-1013.
- Edgar, A.J., and J.M. Polak. 2000. Human homologues of yeast vacuolar protein sorting 29 and 35. *Biochem Biophys Res Commun*. 277:622-630.
- Eggers, C.T., J.C. Schafer, J.R. Goldenring, and S.S. Taylor. 2009. D-AKAP2 interacts with Rab4 and Rab11 through its RGS domains and regulates transferrin receptor recycling. *The Journal of biological chemistry*. 284:32869-32880.
- Esashi, E., M. Bao, Y.H. Wang, W. Cao, and Y.J. Liu. 2012. PACSIN1 regulates the TLR7/9-mediated type I interferon response in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 42:573-579.
- Eyster, C.A., J.D. Higginson, R. Huebner, N. Porat-Shliom, R. Weigert, W.W. Wu, R.F. Shen, and J.G. Donaldson. 2009. Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. *Traffic*. 10:590-599.
- Faini, M., R. Beck, F.T. Wieland, and J.A. Briggs. 2013. Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends in cell biology*. 23:279-288.

- Farias, G.G., L. Cuitino, X. Guo, X. Ren, M. Jarnik, R. Mattera, and J.S. Bonifacino. 2012. Signal-mediated, AP-1/clathrin-dependent sorting of transmembrane receptors to the somatodendritic domain of hippocampal neurons. *Neuron*. 75:810-823.
- Faundez, V., J.T. Horng, and R.B. Kelly. 1998. A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell*. 93:423-432.
- Faundez, V.V., and R.B. Kelly. 2000. The AP-3 complex required for endosomal synaptic vesicle biogenesis is associated with a casein kinase I α -like isoform. *Molecular biology of the cell*. 11:2591-2604.
- Ferguson, S.M., and P. De Camilli. 2012. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 13:75-88.
- Fischer, J., T. Weide, and A. Barnekow. 2005. The MICAL proteins and rab1: a possible link to the cytoskeleton? *Biochem Biophys Res Commun*. 328:415-423.
- Flannagan, R.S., V. Jaumouille, and S. Grinstein. 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*. 7:61-98.
- Foley, K.P., and A. Klip. 2014. Dynamic GLUT4 sorting through a syntaxin-6 compartment in muscle cells is derailed by insulin resistance-causing ceramide. *Biology open*. 3:314-325.
- Folsch, H., H. Ohno, J.S. Bonifacino, and I. Mellman. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell*. 99:189-198.
- Folsch, H., M. Pypaert, S. Maday, L. Pelletier, and I. Mellman. 2003. The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains. *The Journal of cell biology*. 163:351-362.
- Ford, M.G., I.G. Mills, B.J. Peter, Y. Vallis, G.J. Praefcke, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*. 419:361-366.
- Fotin, A., Y. Cheng, N. Grigorieff, T. Walz, S.C. Harrison, and T. Kirchhausen. 2004a. Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature*. 432:649-653.
- Fotin, A., Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S.C. Harrison, T. Kirchhausen, and T. Walz. 2004b. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature*. 432:573-579.
- Fotin, A., T. Kirchhausen, N. Grigorieff, S.C. Harrison, T. Walz, and Y. Cheng. 2006. Structure determination of clathrin coats to subnanometer resolution by single particle cryo-electron microscopy. *J Struct Biol*. 156:453-460.
- Fraley, T.S., C.B. Pereira, T.C. Tran, C. Singleton, and J.A. Greenwood. 2005. Phosphoinositide binding regulates alpha-actinin dynamics: mechanism for modulating cytoskeletal remodeling. *The Journal of biological chemistry*. 280:15479-15482.
- Frick, M., N.A. Bright, K. Riento, A. Bray, C. Merrified, and B.J. Nichols. 2007. Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Current biology : CB*. 17:1151-1156.
- Frittoli, E., A. Palamidessi, P. Marighetti, S. Confalonieri, F. Bianchi, C. Malinverno, G. Mazzarol, G. Viale, I. Martin-Padura, M. Garre, D. Parazzoli, V. Mattei, S. Cortellino, G. Bertalot, P.P. Di Fiore, and G. Scita. 2014. A RAB5/RAB4 recycling circuitry induces a proteolytic invasive program and promotes tumor dissemination. *The Journal of cell biology*. 206:307-328.

- Fukami, K., K. Furuhashi, M. Inagaki, T. Endo, S. Hatano, and T. Takenawa. 1992. Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. *Nature*. 359:150-152.
- Gaidarov, I., and J.H. Keen. 1999. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *The Journal of cell biology*. 146:755-764.
- Galperin, E., S. Benjamin, D. Rapaport, R. Rotem-Yehudar, S. Tolchinsky, and M. Horowitz. 2002. EHD3: a protein that resides in recycling tubular and vesicular membrane structures and interacts with EHD1. *Traffic*. 3:575-589.
- Gambin, Y., N. Ariotti, K.A. McMahon, M. Bastiani, E. Sierrecki, O. Kovtun, M.E. Polinkovsky, A. Magenau, W. Jung, S. Okano, Y. Zhou, N. Leneva, S. Mureev, W. Johnston, K. Gaus, J.F. Hancock, B.M. Collins, K. Alexandrov, and R.G. Parton. 2014. Single-molecule analysis reveals self assembly and nanoscale segregation of two distinct cavin subcomplexes on caveolae. *Elife*. 3:e01434.
- Garcia-Castillo, M.D., T. Tran, A. Bobard, H.F. Renard, S.J. Rathjen, E. Dransart, B. Stechmann, C. Lamaze, M. Lord, J.C. Cintrat, J. Enninga, E. Tartour, and L. Johannes. 2015. Retrograde transport is not required for cytosolic translocation of the B-subunit of Shiga toxin. *Journal of cell science*. 128:2373-2387.
- George, M., G. Ying, M.A. Rainey, A. Solomon, P.T. Parikh, Q. Gao, V. Band, and H. Band. 2007. Shared as well as distinct roles of EHD proteins revealed by biochemical and functional comparisons in mammalian cells and *C. elegans*. *BMC Cell Biol*. 8:3.
- Gerges, N.Z., D.S. Backos, and J.A. Esteban. 2004. Local control of AMPA receptor trafficking at the postsynaptic terminal by a small GTPase of the Rab family. *The Journal of biological chemistry*. 279:43870-43878.
- Gerondopoulos, A., L. Langemeyer, J.R. Liang, A. Linford, and F.A. Barr. 2012. BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Current biology : CB*. 22:2135-2139.
- Gesbert, F., N. Sauvonnnet, and A. Dautry-Varsat. 2004. Clathrin-Independent endocytosis and signalling of interleukin 2 receptors IL-2R endocytosis and signalling. *Curr Top Microbiol Immunol*. 286:119-148.
- Gidon, A., S. Bardin, B. Cinquin, J. Boulanger, F. Waharte, L. Heliot, H. de la Salle, D. Hanau, C. Kervrann, B. Goud, and J. Salamero. 2012. A Rab11A/myosin Vb/Rab11-FIP2 complex frames two late recycling steps of langerin from the ERC to the plasma membrane. *Traffic*. 13:815-833.
- Gillingham, A.K., and S. Munro. 2003. Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1641:71-85.
- Gimona, M., K. Djinovic-Carugo, W.J. Kranewitter, and S.J. Winder. 2002. Functional plasticity of CH domains. *FEBS letters*. 513:98-106.
- Giridharan, S.S., B. Cai, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2012a. Trafficking cascades mediated by Rab35 and its membrane hub effector, MICAL-L1. *Communicative & integrative biology*. 5:384-387.
- Giridharan, S.S., B. Cai, N. Vitale, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2013. Cooperation of MICAL-L1, syndapin2, and phosphatidic acid in tubular recycling endosome biogenesis. *Molecular biology of the cell*. 24:1776-1790, S1771-1715.
- Giridharan, S.S., and S. Caplan. 2014. MICAL-family proteins: Complex regulators of the actin cytoskeleton. *Antioxid Redox Signal*. 20:2059-2073.

- Giridharan, S.S., J.L. Rohn, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2012b. Differential regulation of actin microfilaments by human MICAL proteins. *Journal of cell science*. 125:614-624.
- Glebov, O.O., N.A. Bright, and B.J. Nichols. 2006. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature cell biology*. 8:46-54.
- Gomez, T.S., and D.D. Billadeau. 2009. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Developmental cell*. 17:699-711.
- Gong, Q., M. Weide, C. Huntsman, Z. Xu, L.Y. Jan, and D. Ma. 2007. Identification and characterization of a new class of trafficking motifs for controlling clathrin-independent internalization and recycling. *The Journal of biological chemistry*. 282:13087-13097.
- Goud, B., and P.A. Gleeson. 2010. TGN golgins, Rabs and cytoskeleton: regulating the Golgi trafficking highways. *Trends in cell biology*. 20:329-336.
- Goueli, B.S., M.B. Powell, E.C. Finger, and S.R. Pfeffer. 2012. TBC1D16 is a Rab4A GTPase activating protein that regulates receptor recycling and EGF receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:15787-15792.
- Grant, B.D., and S. Caplan. 2008. Mechanisms of EHD/RME-1 protein function in endocytic transport. *Traffic*. 9:2043-2052.
- Grant, B.D., and J.G. Donaldson. 2009. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:597-608.
- Grassart, A., A. Dujancourt, P.B. Lazarow, A. Dautry-Varsat, and N. Sauvonnet. 2008. Clathrin-independent endocytosis used by the IL-2 receptor is regulated by Rac1, Pak1 and Pak2. *EMBO reports*. 9:356-362.
- Gravotta, D., J.M. Carvajal-Gonzalez, R. Mattera, S. Deborde, J.R. Banfelder, J.S. Bonifacino, and E. Rodriguez-Boulan. 2012. The clathrin adaptor AP-1A mediates basolateral polarity. *Developmental cell*. 22:811-823.
- Gravotta, D., A. Deora, E. Perret, C. Oyanadel, A. Soza, R. Schreiner, A. Gonzalez, and E. Rodriguez-Boulan. 2007. AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:1564-1569.
- Griffiths, G., B. Hoflack, K. Simons, I. Mellman, and S. Kornfeld. 1988. The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell*. 52:329-341.
- Grigoriev, I., K.L. Yu, E. Martinez-Sanchez, A. Serra-Marques, I. Smal, E. Meijering, J. Demmers, J. Peranen, R.J. Pasterkamp, P. van der Sluijs, C.C. Hoogenraad, and A. Akhmanova. 2011. Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Current biology : CB*. 21:967-974.
- Gudmundsson, H., T.J. Hund, P.J. Wright, C.F. Kline, J.S. Snyder, L. Qian, O.M. Koval, S.R. Cunha, M. George, M.A. Rainey, F.E. Kashef, W. Dun, P.A. Boyden, M.E. Anderson, H. Band, and P.J. Mohler. 2010. EH domain proteins regulate cardiac membrane protein targeting. *Circ Res*. 107:84-95.
- Guichard, A., V. Nizet, and E. Bier. 2014. RAB11-mediated trafficking in host-pathogen interactions. *Nat Rev Microbiol*. 12:624-634.
- Guilherme, A., N.A. Soriano, S. Bose, J. Holik, A. Bose, D.P. Pomerleau, P. Furcinitti, J. Leszyk, S. Corvera, and M.P. Czech. 2004a. EHD2 and the novel EH domain binding protein EHBP1 couple endocytosis to the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*. 279:10593-10605.

- Guilherme, A., N.A. Soriano, P.S. Furcinitti, and M.P. Czech. 2004b. Role of EHD1 and EHBP1 in perinuclear sorting and insulin-regulated GLUT4 recycling in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 279:40062-40075.
- Guo, X., R. Mattera, X. Ren, Y. Chen, C. Retamal, A. Gonzalez, and J.S. Bonifacino. 2013. The adaptor protein-1 mu1B subunit expands the repertoire of basolateral sorting signal recognition in epithelial cells. *Developmental cell*. 27:353-366.
- Gupta, G.D., M.G. Swetha, S. Kumari, R. Lakshminarayan, G. Dey, and S. Mayor. 2009. Analysis of endocytic pathways in Drosophila cells reveals a conserved role for GBF1 in internalization via GEECs. *PloS one*. 4:e6768.
- Gustafsson, M.G., L. Shao, P.M. Carlton, C.J. Wang, I.N. Golubovskaya, W.Z. Cande, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 2008. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J*. 94:4957-4970.
- Haffner, C., G. Di Paolo, J.A. Rosenthal, and P. de Camilli. 2000. Direct interaction of the 170 kDa isoform of synaptojanin 1 with clathrin and with the clathrin adaptor AP-2. *Current biology : CB*. 10:471-474.
- Haft, C.R., M. de la Luz Sierra, R. Bafford, M.A. Lesniak, V.A. Barr, and S.I. Taylor. 2000. Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Molecular biology of the cell*. 11:4105-4116.
- Haglund, K., and I. Dikic. 2012. The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *Journal of cell science*. 125:265-275.
- Hansen, C.G., G. Howard, and B.J. Nichols. 2011. Pacsin 2 is recruited to caveolae and functions in caveolar biogenesis. *Journal of cell science*. 124:2777-2785.
- Hanson, P.I., J.E. Heuser, and R. Jahn. 1997. Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol*. 7:310-315.
- Harbour, M.E., S.Y. Breusegem, R. Antrobus, C. Freeman, E. Reid, and M.N. Seaman. 2010. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *Journal of cell science*. 123:3703-3717.
- Harbour, M.E., S.Y. Breusegem, and M.N. Seaman. 2012. Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended 'tail' of Fam21 binding to the retromer protein Vps35. *The Biochemical journal*. 442:209-220.
- Harterink, M., F. Port, M.J. Lorenowicz, I.J. McGough, M. Silhankova, M.C. Betist, J.R. van Weering, R.G. van Heesbeen, T.C. Middelkoop, K. Basler, P.J. Cullen, and H.C. Korswagen. 2011. A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. *Nature cell biology*. 13:914-923.
- Hatton, N., E. Lintz, M. Mahankali, K. Henkels, and J. Gomez-Cambronero. 2015. Phosphatidic acid (PA) increases EGF receptor (EGFR) expression by stabilizing mRNA, inhibiting RNase-A, and by inhibiting lysosomal and proteasomal degradation of the internalized EGFR. *Molecular and cellular biology*.
- Hattula, K., J. Furuholm, J. Tikkanen, K. Tanhuanpaa, P. Laakkonen, and J. Peranen. 2006. Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *Journal of cell science*. 119:4866-4877.
- Heasman, S.J., and A.J. Ridley. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:690-701.

- Henne, W.M., E. Boucrot, M. Meinecke, E. Evergren, Y. Vallis, R. Mittal, and H.T. McMahon. 2010. FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science*. 328:1281-1284.
- Henne, W.M., N.J. Buchkovich, and S.D. Emr. 2011. The ESCRT pathway. *Developmental cell*. 21:77-91.
- Henry, L., and D.R. Sheff. 2008. Rab8 regulates basolateral secretory, but not recycling, traffic at the recycling endosome. *Molecular biology of the cell*. 19:2059-2068.
- Hickson, G.R., J. Matheson, B. Riggs, V.H. Maier, A.B. Fielding, R. Prekeris, W. Sullivan, F.A. Barr, and G.W. Gould. 2003. Arfophilins are dual Arf/Rab 11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to *Drosophila* nuclear fallout. *Mol Biol Cell*. 14:2908-2920.
- Hill, M.M., M. Bastiani, R. Luetterforst, M. Kirkham, A. Kirkham, S.J. Nixon, P. Walser, D. Abankwa, V.M. Oorschot, S. Martin, J.F. Hancock, and R.G. Parton. 2008. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell*. 132:113-124.
- Hirata, E., D. Park, and E. Sahai. 2014. Retrograde flow of cadherins in collective cell migration. *Nature cell biology*. 16:621-623.
- Hirst, J., L.D. Barlow, G.C. Francisco, D.A. Sahlender, M.N. Seaman, J.B. Dacks, and M.S. Robinson. 2011. The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol*. 9:e1001170.
- Hirst, J., G.H. Borner, J. Edgar, M.Y. Hein, M. Mann, F. Buchholz, R. Antrobus, and M.S. Robinson. 2013. Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. *Molecular biology of the cell*. 24:2558-2569.
- Hirst, J., A. Motley, K. Harasaki, S.Y. Peak Chew, and M.S. Robinson. 2003. EpsinR: an ENTH domain-containing protein that interacts with AP-1. *Molecular biology of the cell*. 14:625-641.
- Holloway, Z.G., A. Velayos-Baeza, G.J. Howell, C. Levecque, S. Ponnambalam, E. Sztul, and A.P. Monaco. 2013. Trafficking of the Menkes copper transporter ATP7A is regulated by clathrin-, AP-2-, AP-1-, and Rab22-dependent steps. *Molecular biology of the cell*. 24:1735-1748, S1731-1738.
- Hong, W. 2005. SNAREs and traffic. *Biochimica et biophysica acta*. 1744:120-144.
- Hong, W., and S. Lev. 2014. Tethering the assembly of SNARE complexes. *Trends in cell biology*. 24:35-43.
- Horgan, C.P., A. Oleksy, A.V. Zhdanov, P.Y. Lall, I.J. White, A.R. Khan, C.E. Futter, J.G. McCaffrey, and M.W. McCaffrey. 2007. Rab11-FIP3 is critical for the structural integrity of the endosomal recycling compartment. *Traffic*. 8:414-430.
- Howes, M.T., M. Kirkham, J. Riches, K. Cortese, P.J. Walser, F. Simpson, M.M. Hill, A. Jones, R. Lundmark, M.R. Lindsay, D.J. Hernandez-Deviez, G. Hadzic, A. McCluskey, R. Bashir, L. Liu, P. Pilch, H. McMahon, P.J. Robinson, J.F. Hancock, S. Mayor, and R.G. Parton. 2010. Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *The Journal of cell biology*. 190:675-691.
- Hsiao, J.C., L.W. Chu, Y.T. Lo, S.P. Lee, T.J. Chen, C.Y. Huang, Y.H. Ping, and W. Chang. 2015. Intracellular Transport of Vaccinia Virus in HeLa Cells Requires WASH-VPEF/FAM21-Retromer Complexes and Recycling molecules Rab11 and Rab22. *J Virol*.

- Huang, H.C., C.C. Chen, W.C. Chang, M.H. Tao, and C. Huang. 2012. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol.* 86:9443-9453.
- Hung, R.J., C.W. Pak, and J.R. Terman. 2011. Direct redox regulation of F-actin assembly and disassembly by Mical. *Science.* 334:1710-1713.
- Hung, R.J., C.S. Spaeth, H.G. Yesilyurt, and J.R. Terman. 2013. SelR reverses Mical-mediated oxidation of actin to regulate F-actin dynamics. *Nature cell biology.* 15:1445-1454.
- Hung, R.J., U. Yazdani, J. Yoon, H. Wu, T. Yang, N. Gupta, Z. Huang, W.J. van Berkel, and J.R. Terman. 2010. Mical links semaphorins to F-actin disassembly. *Nature.* 463:823-827.
- Hunziker, W., and P.J. Peters. 1998. Rab17 localizes to recycling endosomes and regulates receptor-mediated transcytosis in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry.* 273:15734-15741.
- Huotari, J., and A. Helenius. 2011. Endosome maturation. *The EMBO journal.* 30:3481-3500.
- Hussain, N.K., S. Jenna, M. Glogauer, C.C. Quinn, S. Wasiak, M. Guipponi, S.E. Antonarakis, B.K. Kay, T.P. Stossel, N. Lamarche-Vane, and P.S. McPherson. 2001. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nature cell biology.* 3:927-932.
- Ioannou, M.S., E.S. Bell, M. Girard, M. Chaineau, J.N. Hamlin, M. Daubaras, A. Monast, M. Park, L. Hodgson, and P.S. McPherson. 2015. DENND2B activates Rab13 at the leading edge of migrating cells and promotes metastatic behavior. *The Journal of cell biology.* 208:629-648.
- Itoh, T., S. Koshiba, T. Kigawa, A. Kikuchi, S. Yokoyama, and T. Takenawa. 2001. Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science.* 291:1047-1051.
- Iversen, T.G., G. Skretting, A. Llorente, P. Nicoziani, B. van Deurs, and K. Sandvig. 2001. Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases. *Molecular biology of the cell.* 12:2099-2107.
- Izumi, Y., S. Hirai, Y. Tamai, A. Fujise-Matsuoka, Y. Nishimura, and S. Ohno. 1997. A protein kinase C delta-binding protein SRBC whose expression is induced by serum starvation. *The Journal of biological chemistry.* 272:7381-7389.
- Jackson, L.P., B.T. Kelly, A.J. McCoy, T. Gaffry, L.C. James, B.M. Collins, S. Honing, P.R. Evans, and D.J. Owen. 2010. A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell.* 141:1220-1229.
- Jahn, R., T. Lang, and T.C. Sudhof. 2003. Membrane fusion. *Cell.* 112:519-533.
- Jahn, R., and R.H. Scheller. 2006. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 7:631-643.
- Jansa, P., S.W. Mason, U. Hoffmann-Rohrer, and I. Grummt. 1998. Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *The EMBO journal.* 17:2855-2864.
- Jerdeva, G.V., D.B. Tesar, K.E. Huey-Tubman, M.S. Ladinsky, S.E. Fraser, and P.J. Bjorkman. 2010. Comparison of FcRn- and plgR-mediated transport in MDCK cells by fluorescence confocal microscopy. *Traffic.* 11:1205-1220.
- Jia, D., T.S. Gomez, Z. Metlagel, J. Umetani, Z. Otwinowski, M.K. Rosen, and D.D. Billadeau. 2010. WASH and WAVE actin regulators of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family are controlled by analogous structurally

- related complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:10442-10447.
- Johannes, L., R.G. Parton, P. Bassereau, and S. Mayor. 2015. Building endocytic pits without clathrin. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 16:311-321.
- Johannes, L., and V. Popoff. 2008. Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell*. 135:1175-1187.
- Johannes, L., and C. Wunder. 2011. Retrograde transport: two (or more) roads diverged in an endosomal tree? *Traffic*. 12:956-962.
- Jongbloets, B.C., and R.J. Pasterkamp. 2014. Semaphorin signalling during development. *Development*. 141:3292-3297.
- Jovanovic, O.A., F.D. Brown, and J.G. Donaldson. 2006. An effector domain mutant of Arf6 implicates phospholipase D in endosomal membrane recycling. *Mol Biol Cell*. 17:327-335.
- Jovic, M., F. Kieken, N. Naslavsky, P.L. Sorgen, and S. Caplan. 2009. Eps15 homology domain 1-associated tubules contain phosphatidylinositol-4-phosphate and phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate and are required for efficient recycling. *Molecular biology of the cell*. 20:2731-2743.
- Jovic, M., N. Naslavsky, D. Rapaport, M. Horowitz, and S. Caplan. 2007. EHD1 regulates beta1 integrin endosomal transport: effects on focal adhesions, cell spreading and migration. *Journal of cell science*. 120:802-814.
- Kahn, R.A., J. Cherfils, M. Elias, R.C. Lovering, S. Munro, and A. Schurmann. 2006. Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *The Journal of cell biology*. 172:645-650.
- Kalthoff, C., S. Groos, R. Kohl, S. Mahrhold, and E.J. Ungewickell. 2002. Clint: a novel clathrin-binding ENTH-domain protein at the Golgi. *Molecular biology of the cell*. 13:4060-4073.
- Kamiguchi, H., K.E. Long, M. Pendergast, A.W. Schaefer, I. Rapoport, T. Kirchhausen, and V. Lemmon. 1998. The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:5311-5321.
- Kanaseki, T., and K. Kadota. 1969. The "vesicle in a basket". A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *The Journal of cell biology*. 42:202-220.
- Kanda, I., N. Nishimura, H. Nakatsuji, R. Yamamura, H. Nakanishi, and T. Sasaki. 2008. Involvement of Rab13 and JRAB/MICAL-L2 in epithelial cell scattering. *Oncogene*. 27:1687-1695.
- Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*. 106:145-155.
- Kaufmann, S.H. 2008. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol*. 9:705-712.
- Kay, B.K., M.P. Williamson, and M. Sudol. 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 14:231-241.
- Keen, J.H., M.C. Willingham, and I.H. Pastan. 1979. Clathrin-coated vesicles: isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell*. 16:303-312.

- Kelly, B.T., A.J. McCoy, K. Spate, S.E. Miller, P.R. Evans, S. Honing, and D.J. Owen. 2008. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature*. 456:976-979.
- Kerr, M.C., and R.D. Teasdale. 2009. Defining macropinocytosis. *Traffic*. 10:364-371.
- Kinchen, J.M., and K.S. Ravichandran. 2010. Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature*. 464:778-782.
- Kirchhausen, T. 2012. Bending membranes. *Nature cell biology*. 14:906-908.
- Kirchhausen, T., and S.C. Harrison. 1981. Protein organization in clathrin trimers. *Cell*. 23:755-761.
- Kirchhausen, T., D. Owen, and S.C. Harrison. 2014. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 6:a016725.
- Kirilly, D., Y. Gu, Y. Huang, Z. Wu, A. Bashirullah, B.C. Low, A.L. Kolodkin, H. Wang, and F. Yu. 2009. A genetic pathway composed of Sox14 and Mical governs severing of dendrites during pruning. *Nature neuroscience*. 12:1497-1505.
- Kirkham, M., A. Fujita, R. Chadda, S.J. Nixon, T.V. Kurzchalia, D.K. Sharma, R.E. Pagano, J.F. Hancock, S. Mayor, and R.G. Parton. 2005. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *The Journal of cell biology*. 168:465-476.
- Klip, A., Y. Sun, T.T. Chiu, and K.P. Foley. 2014. Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *American journal of physiology. Cell physiology*. 306:C879-886.
- Ko, G., S. Paradise, H. Chen, M. Graham, M. Vecchi, F. Bianchi, O. Cremona, P.P. Di Fiore, and P. De Camilli. 2010. Selective high-level expression of epsin 3 in gastric parietal cells, where it is localized at endocytic sites of apical canaliculi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:21511-21516.
- Kobayashi, H., K. Etoh, and M. Fukuda. 2014a. Rab35 is translocated from Arf6-positive perinuclear recycling endosomes to neurite tips during neurite outgrowth. *Small GTPases*. 5:e29290.
- Kobayashi, H., K. Etoh, N. Ohbayashi, and M. Fukuda. 2014b. Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-L1 during neurite outgrowth. *Biol Open*. 3:803-814.
- Kobayashi, H., and M. Fukuda. 2012. Rab35 regulates Arf6 activity through centaurin-beta2 (ACAP2) during neurite outgrowth. *Journal of cell science*. 125:2235-2243.
- Kobayashi, H., and M. Fukuda. 2013a. Arf6, Rab11 and transferrin receptor define distinct populations of recycling endosomes. *Communicative & integrative biology*. 6:e25036.
- Kobayashi, H., and M. Fukuda. 2013b. Rab35 establishes the EHD1-association site by coordinating two distinct effectors during neurite outgrowth. *Journal of cell science*. 126:2424-2435.
- Kohler, K., D. Louvard, and A. Zahraoui. 2004. Rab13 regulates PKA signaling during tight junction assembly. *The Journal of cell biology*. 165:175-180.
- Kohler, K., and A. Zahraoui. 2005. Tight junction: a co-ordinator of cell signalling and membrane trafficking. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 97:659-665.

- Kolonko, M., A.C. Geffken, T. Blumer, K. Hagens, U.E. Schaible, and M. Hagedorn. 2014. WASH-driven actin polymerization is required for efficient mycobacterial phagosome maturation arrest. *Cellular microbiology*. 16:232-246.
- Korenbaum, E., and F. Rivero. 2002. Calponin homology domains at a glance. *Journal of cell science*. 115:3543-3545.
- Kostelansky, M.S., C. Schluter, Y.Y. Tam, S. Lee, R. Ghirlando, B. Beach, E. Conibear, and J.H. Hurley. 2007. Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell*. 129:485-498.
- Kouranti, I., M. Sachse, N. Arouche, B. Goud, and A. Echard. 2006. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Current biology : CB*. 16:1719-1725.
- Kovtun, O., V.A. Tillu, N. Ariotti, R.G. Parton, and B.M. Collins. 2015. Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *Journal of cell science*. 128:1269-1278.
- Kovtun, O., V.A. Tillu, W. Jung, N. Leneva, N. Ariotti, N. Chaudhary, R.A. Mandyam, C. Ferguson, G.P. Morgan, W.A. Johnston, S.J. Harrop, K. Alexandrov, R.G. Parton, and B.M. Collins. 2014. Structural insights into the organization of the cavin membrane coat complex. *Developmental cell*. 31:405-419.
- Kumari, S., and S. Mayor. 2008. ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. *Nature cell biology*. 10:30-41.
- Kurzchalia, T.V., P. Dupree, R.G. Parton, R. Kellner, H. Virta, M. Lehnert, and K. Simons. 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *The Journal of cell biology*. 118:1003-1014.
- Lakadamyali, M., M.J. Rust, and X. Zhuang. 2006. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell*. 124:997-1009.
- Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah, and A. Dautry-Varsat. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Molecular cell*. 7:661-671.
- Lau, A.W., and M.M. Chou. 2008. The adaptor complex AP-2 regulates post-endocytic trafficking through the non-clathrin Arf6-dependent endocytic pathway. *Journal of cell science*. 121:4008-4017.
- Lauffer, B.E., C. Melero, P. Temkin, C. Lei, W. Hong, T. Kortemme, and M. von Zastrow. 2010. SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *The Journal of cell biology*. 190:565-574.
- Lee, D.W., X. Zhao, S. Scarselletta, P.J. Schweinsberg, E. Eisenberg, B.D. Grant, and L.E. Greene. 2005. ATP binding regulates oligomerization and endosome association of RME-1 family proteins. *The Journal of biological chemistry*. 280:17213-17220.
- Lee, S., Y. Uchida, J. Wang, T. Matsudaira, T. Nakagawa, T. Kishimoto, K. Mukai, T. Inaba, T. Kobayashi, R.S. Molday, T. Taguchi, and H. Arai. 2015. Transport through recycling endosomes requires EHD1 recruitment by a phosphatidylserine translocase. *The EMBO journal*.
- Lemmon, S.K. 2001. Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Current biology : CB*. 11:R49-52.
- Lenz, M., S. Morlot, and A. Roux. 2009. Mechanical requirements for membrane fission: common facts from various examples. *FEBS letters*. 583:3839-3846.
- Lichte, B., R.W. Veh, H.E. Meyer, and M.W. Kilimann. 1992. Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *The EMBO journal*. 11:2521-2530.

- Lieu, Z.Z., M.C. Derby, R.D. Teasdale, C. Hart, P. Gunn, and P.A. Gleeson. 2007. The golgin GCC88 is required for efficient retrograde transport of cargo from the early endosomes to the trans-Golgi network. *Molecular biology of the cell*. 18:4979-4991.
- Lieu, Z.Z., and P.A. Gleeson. 2010. Identification of different itineraries and retromer components for endosome-to-Golgi transport of TGN38 and Shiga toxin. *Eur J Cell Biol*. 89:379-393.
- Lin, S.X., B. Grant, D. Hirsh, and F.R. Maxfield. 2001. Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytic recycling compartment in mammalian cells. *Nature cell biology*. 3:567-572.
- Linder, M.D., R.L. Uronen, M. Holtta-Vuori, P. van der Sluijs, J. Peranen, and E. Ikonen. 2007. Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol Biol Cell*. 18:47-56.
- Liu, S.H., M.L. Wong, C.S. Craik, and F.M. Brodsky. 1995. Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell*. 83:257-267.
- Lock, J.G., and J.L. Stow. 2005. Rab11 in recycling endosomes regulates the sorting and basolateral transport of E-cadherin. *Molecular biology of the cell*. 16:1744-1755.
- Lowery, D.M., K.R. Clauser, M. Hjerrild, D. Lim, J. Alexander, K. Kishi, S.E. Ong, S. Gammeltoft, S.A. Carr, and M.B. Yaffe. 2007. Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. *The EMBO journal*. 26:2262-2273.
- Lu, Q., C. Insinna, C. Ott, J. Stauffer, P.A. Pintado, J. Rahajeng, U. Baxa, V. Walia, A. Cuenca, Y.S. Hwang, I.O. Daar, S. Lopes, J. Lippincott-Schwartz, P.K. Jackson, S. Caplan, and C.J. Westlake. 2015. Early steps in primary cilium assembly require EHD1/EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nature cell biology*. 17:228-240.
- Ludwig, A., G. Howard, C. Mendoza-Topaz, T. Deerinck, M. Mackey, S. Sandin, M.H. Ellisman, and B.J. Nichols. 2013. Molecular composition and ultrastructure of the caveolar coat complex. *PLoS Biol*. 11:e1001640.
- Lundmark, R., and S.R. Carlsson. 2004. Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9. *The Journal of biological chemistry*. 279:42694-42702.
- Lundmark, R., G.J. Doherty, M.T. Howes, K. Cortese, Y. Vallis, R.G. Parton, and H.T. McMahon. 2008. The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway. *Current biology : CB*. 18:1802-1808.
- Magadan, J.G., M.A. Barbieri, R. Mesa, P.D. Stahl, and L.S. Mayorga. 2006. Rab22a regulates the sorting of transferrin to recycling endosomes. *Molecular and cellular biology*. 26:2595-2614.
- Maldonado-Baez, L., C. Williamson, and J.G. Donaldson. 2013. Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view. *Experimental cell research*. 319:2759-2769.
- Mallard, F., C. Antony, D. Tenza, J. Salamero, B. Goud, and L. Johannes. 1998. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *The Journal of cell biology*. 143:973-990.
- Malsam, J., S. Kreye, and T.H. Sollner. 2008. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 65:2814-2832.

- Mann, F., and G. Rougon. 2007. Mechanisms of axon guidance: membrane dynamics and axonal transport in semaphorin signalling. *J Neurochem.* 102:316-323.
- Maritzen, T., H. Schachtner, and D.F. Legler. 2015. On the move: endocytic trafficking in cell migration. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 72:2119-2134.
- Martinez-Outschoorn, U.E., F. Sotgia, and M.P. Lisanti. 2015. Caveolae and signalling in cancer. *Nat Rev Cancer.* 15:225-237.
- Marzesco, A.M., I. Dunia, R. Pandjaitan, M. Recouvreur, D. Dauzonne, E.L. Benedetti, D. Louvard, and A. Zahraoui. 2002. The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 13:1819-1831.
- Marzesco, A.M., and A. Zahraoui. 2005. Assay of Rab13 in Regulating Epithelial Tight Junction Assembly. 403:182-193.
- Mason, A.K., B.E. Jacobs, and P.A. Welling. 2008. AP-2-dependent internalization of potassium channel Kir2.3 is driven by a novel di-hydrophobic signal. *The Journal of biological chemistry.* 283:5973-5984.
- Massol, R.H., W. Boll, A.M. Griffin, and T. Kirchhausen. 2006. A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103:10265-10270.
- Matsuda, S., E. Miura, K. Matsuda, W. Kakegawa, K. Kohda, M. Watanabe, and M. Yuzaki. 2008. Accumulation of AMPA receptors in autophagosomes in neuronal axons lacking adaptor protein AP-4. *Neuron.* 57:730-745.
- Mattera, R., M. Boehm, R. Chaudhuri, Y. Prabhu, and J.S. Bonifacino. 2011. Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. *The Journal of biological chemistry.* 286:2022-2030.
- Mayor, S., R.G. Parton, and J.G. Donaldson. 2014. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 6.
- McCaffrey, M.W., A. Bielli, G. Cantalupo, S. Mora, V. Roberti, M. Santillo, F. Drummond, and C. Bucci. 2001. Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS letters.* 495:21-30.
- McGough, I.J., F. Steinberg, M. Gallon, A. Yatsu, N. Ohbayashi, K.J. Heesom, M. Fukuda, and P.J. Cullen. 2014. Identification of molecular heterogeneity in SNX27-retromer-mediated endosome-to-plasma-membrane recycling. *Journal of cell science.* 127:4940-4953.
- McMahon, H.T., and E. Boucrot. 2015. Membrane curvature at a glance. *Journal of cell science.* 128:1065-1070.
- McNew, J.A., F. Parlati, R. Fukuda, R.J. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T.H. Sollner, and J.E. Rothman. 2000. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature.* 407:153-159.
- Meng, H., L. Tian, J. Zhou, Z. Li, X. Jiao, W.W. Li, M. Plomann, Z. Xu, M.P. Lisanti, C. Wang, and R.G. Pestell. 2011. PACSIN 2 represses cellular migration through direct association with cyclin D1 but not its alternate splice form cyclin D1b. *Cell Cycle.* 10:73-81.
- Mercer, J., and A. Helenius. 2009. Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology.* 11:510-520.
- Merrifield, C.J. 2012. Fishing for clathrin-coated pit nucleators. *Nature cell biology.* 14:452-454.

- Merrifield, C.J., D. Perrais, and D. Zenisek. 2005. Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell*. 121:593-606.
- Mesaki, K., K. Tanabe, M. Obayashi, N. Oe, and K. Takei. 2011. Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS one*. 6:e19764.
- Meyer, C., D. Zizioli, S. Lausmann, E.L. Eskelinen, J. Hamann, P. Saftig, K. von Figura, and P. Schu. 2000. mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *The EMBO journal*. 19:2193-2203.
- Miaczynska, M., S. Christoforidis, A. Giner, A. Shevchenko, S. Uttenweiler-Joseph, B. Habermann, M. Wilm, R.G. Parton, and M. Zerial. 2004. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*. 116:445-456.
- Miller, S.E., S. Mathiasen, N.A. Bright, F. Pierre, B.T. Kelly, N. Kladt, A. Schauss, C.J. Merrifield, D. Stamou, S. Honing, and D.J. Owen. 2015. CALM Regulates Clathrin-Coated Vesicle Size and Maturation by Directly Sensing and Driving Membrane Curvature. *Developmental cell*. 33:163-175.
- Mills, I.G., G.J. Praefcke, Y. Vallis, B.J. Peter, L.E. Olesen, J.L. Gallop, P.J. Butler, P.R. Evans, and H.T. McMahon. 2003. EpsinR: an AP1/clathrin interacting protein involved in vesicle trafficking. *The Journal of cell biology*. 160:213-222.
- Mizuno-Yamasaki, E., F. Rivera-Molina, and P. Novick. 2012. GTPase networks in membrane traffic. *Annual review of biochemistry*. 81:637-659.
- Modregger, J., B. Ritter, B. Witter, M. Paulsson, and M. Plomann. 2000. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *Journal of cell science*. 113 Pt 24:4511-4521.
- Montagnac, G., A. Echard, and P. Chavrier. 2008. Endocytic traffic in animal cell cytokinesis. *Current opinion in cell biology*. 20:454-461.
- Montagnac, G., J.B. Sibarita, S. Loubery, L. Daviet, M. Romao, G. Raposo, and P. Chavrier. 2009. ARF6 Interacts with JIP4 to control a motor switch mechanism regulating endosome traffic in cytokinesis. *Current biology : CB*. 19:184-195.
- Moren, B., C. Shah, M.T. Howes, N.L. Schieber, H.T. McMahon, R.G. Parton, O. Daumke, and R. Lundmark. 2012. EHD2 regulates caveolar dynamics via ATP-driven targeting and oligomerization. *Molecular biology of the cell*. 23:1316-1329.
- Morgan, J.R., K. Prasad, S. Jin, G.J. Augustine, and E.M. Lafer. 2003. Eps15 homology domain-NPF motif interactions regulate clathrin coat assembly during synaptic vesicle recycling. *The Journal of biological chemistry*. 278:33583-33592.
- Morgan, J.R., X. Zhao, M. Womack, K. Prasad, G.J. Augustine, and E.M. Lafer. 1999. A role for the clathrin assembly domain of AP180 in synaptic vesicle endocytosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 19:10201-10212.
- Morgan, M.R., A. Byron, M.J. Humphries, and M.D. Bass. 2009. Giving off mixed signals--distinct functions of alpha5beta1 and alpha5beta3 integrins in regulating cell behaviour. *IUBMB Life*. 61:731-738.
- Morimoto, S., N. Nishimura, T. Terai, S. Manabe, Y. Yamamoto, W. Shinahara, H. Miyake, S. Tashiro, M. Shimada, and T. Sasaki. 2005. Rab13 mediates the continuous endocytic recycling of occludin to the cell surface. *The Journal of biological chemistry*. 280:2220-2228.

- Morinaka, A., M. Yamada, R. Itofusa, Y. Funato, Y. Yoshimura, F. Nakamura, T. Yoshimura, K. Kaibuchi, Y. Goshima, M. Hoshino, H. Kamiguchi, and H. Miki. 2011. Thioredoxin mediates oxidation-dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse. *Science signaling*. 4:ra26.
- Mullins, C., L.M. Hartnell, and J.S. Bonifacino. 2000. Distinct requirements for the AP-3 adaptor complex in pigment granule and synaptic vesicle biogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet*. 263:1003-1014.
- Muzes, G., and F. Sipos. 2014. Relation of immune semaphorin/plexin signaling to carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev*. 23:469-476.
- Nadella, M., M.A. Bianchet, S.B. Gabelli, J. Barrila, and L.M. Amzel. 2005. Structure and activity of the axon guidance protein MICAL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:16830-16835.
- Nakada-Tsukui, K., Y. Saito-Nakano, V. Ali, and T. Nozaki. 2005. A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular biology of the cell*. 16:5294-5303.
- Nakatsuji, H., N. Nishimura, R. Yamamura, H.O. Kanayama, and T. Sasaki. 2008. Involvement of actinin-4 in the recruitment of JRAB/MICAL-L2 to cell-cell junctions and the formation of functional tight junctions. *Molecular and cellular biology*. 28:3324-3335.
- Naslavsky, N., and S. Caplan. 2011. EHD proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends in cell biology*. 21:122-131.
- Naslavsky, N., J. McKenzie, N. Altan-Bonnet, D. Sheff, and S. Caplan. 2009. EHD3 regulates early-endosome-to-Golgi transport and preserves Golgi morphology. *Journal of cell science*. 122:389-400.
- Naslavsky, N., J. Rahajeng, M. Sharma, M. Jovic, and S. Caplan. 2006. Interactions between EHD proteins and Rab11-FIP2: a role for EHD3 in early endosomal transport. *Molecular biology of the cell*. 17:163-177.
- Naslavsky, N., R. Weigert, and J.G. Donaldson. 2003. Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Molecular biology of the cell*. 14:417-431.
- Naslavsky, N., R. Weigert, and J.G. Donaldson. 2004. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Molecular biology of the cell*. 15:3542-3552.
- Nassoy, P., and C. Lamaze. 2012. Stressing caveolae new role in cell mechanics. *Trends in cell biology*. 22:381-389.
- Nichols, B.J., and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*. 11:406-412.
- Nokes, R.L., I.C. Fields, R.N. Collins, and H. Folsch. 2008. Rab13 regulates membrane trafficking between TGN and recycling endosomes in polarized epithelial cells. *The Journal of cell biology*. 182:845-853.
- Nonnenmacher, M., and T. Weber. 2011. Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe*. 10:563-576.
- Nordmann, M., M. Cabrera, A. Perz, C. Brocker, C. Ostrowicz, S. Engelbrecht-Vandre, and C. Ungermann. 2010. The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Current biology : CB*. 20:1654-1659.
- Nossal, R., and J. Zimmerberg. 2002. Endocytosis: curvature to the ENTH degree. *Current biology : CB*. 12:R770-772.

- Novick, P., C. Field, and R. Schekman. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*. 21:205-215.
- O'Bryan, J.P. 2010. Intersecting pathways in cell biology. *Science signaling*. 3:re10.
- Ogata, T., T. Ueyama, K. Isodono, M. Tagawa, N. Takehara, T. Kawashima, K. Harada, T. Takahashi, T. Shioi, H. Matsubara, and H. Oh. 2008. MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Molecular and cellular biology*. 28:3424-3436.
- Okamoto, M., S. Schoch, and T.C. Sudhof. 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? *The Journal of biological chemistry*. 274:18446-18454.
- Ooi, C.E., E.C. Dell'Angelica, and J.S. Bonifacino. 1998. ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *The Journal of cell biology*. 142:391-402.
- Ortiz, D., M. Medkova, C. Walch-Solimena, and P. Novick. 2002. Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *J Cell Biol*. 157:1005-1015.
- Osborne, D.G., J.T. Piotrowski, C.J. Dick, J.S. Zhang, and D.D. Billadeau. 2015. SNX17 affects T cell activation by regulating TCR and integrin recycling. *Journal of immunology*. 194:4555-4566.
- Palacios, F., L. Price, J. Schweitzer, J.G. Collard, and C. D'Souza-Schorey. 2001. An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *The EMBO journal*. 20:4973-4986.
- Palade, G.E. 1953. Fine structure of blood capillaries. *Journal of Applied Physics*. 24:1424.
- Palamidessi, A., E. Frittoli, M. Garre, M. Faretta, M. Mione, I. Testa, A. Diaspro, L. Lanzetti, G. Scita, and P.P. Di Fiore. 2008. Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*. 134:135-147.
- Paleotti, O., E. Macia, F. Luton, S. Klein, M. Partisani, P. Chardin, T. Kirchhausen, and M. Franco. 2005. The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *The Journal of biological chemistry*. 280:21661-21666.
- Palfey, B.A., and C.A. McDonald. 2010. Control of catalysis in flavin-dependent monooxygenases. *Arch Biochem Biophys*. 493:26-36.
- Parachoniak, C.A., Y. Luo, J.V. Abella, J.H. Keen, and M. Park. 2011. GGA3 functions as a switch to promote Met receptor recycling, essential for sustained ERK and cell migration. *Developmental cell*. 20:751-763.
- Park, M., E.C. Penick, J.G. Edwards, J.A. Kauer, and M.D. Ehlers. 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science*. 305:1972-1975.
- Park, S.Y., and X. Guo. 2014. Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Biosci Rep*. 34.
- Parton, R.G., and M.A. del Pozo. 2013. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:98-112.
- Pasterkamp, R.J., H.N. Dai, J.R. Terman, K.J. Wahlin, B. Kim, B.S. Bregman, P.G. Popovich, and A.L. Kolodkin. 2006. MICAL flavoprotein monooxygenases: expression during neural development and following spinal cord injuries in the rat. *Mol Cell Neurosci*. 31:52-69.

- Patino-Lopez, G., X. Dong, K. Ben-Aissa, K.M. Bernot, T. Itoh, M. Fukuda, M.J. Kruhlak, L.E. Samelson, and S. Shaw. 2008. Rab35 and its GAP EPI64C in T cells regulate receptor recycling and immunological synapse formation. *The Journal of biological chemistry*. 283:18323-18330.
- Pearse, B.M. 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *Journal of molecular biology*. 97:93-98.
- Pearse, B.M. 1976. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 73:1255-1259.
- Pelkmans, L., E. Fava, H. Grabner, M. Hannus, B. Habermann, E. Krausz, and M. Zerial. 2005. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*. 436:78-86.
- Pelkmans, L., and M. Zerial. 2005. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*. 436:128-133.
- Pelletan, L.E., L. Suhaiman, C.C. Vaquer, M.A. Bustos, G.A. De Blas, N. Vitale, L.S. Mayorga, and S.A. Belmonte. 2015. ADP ribosylation factor 6 (ARF6) promotes acrosomal exocytosis by modulating lipid turnover and Rab3A activation. *The Journal of biological chemistry*. 290:9823-9841.
- Perrin, L., S. Lacas-Gervais, J. Gilleron, F. Ceppo, F. Prodon, A. Benmerah, J.F. Tanti, and M. Cormont. 2013. Rab4b controls an early endosome sorting event by interacting with the gamma-subunit of the clathrin adaptor complex 1. *Journal of cell science*. 126:4950-4962.
- Pfeffer, S.R. 2009. Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS letters*. 583:3811-3816.
- Pfeffer, S.R. 2013. A prize for membrane magic. *Cell*. 155:1203-1206.
- Posor, Y., M. Eichhorn-Grunig, and V. Haucke. 2015. Phosphoinositides in endocytosis. *Biochimica et biophysica acta*. 1851:794-804.
- Poupon, V., M. Girard, V. Legendre-Guillemain, S. Thomas, L. Bourbonniere, J. Philie, N.A. Bright, and P.S. McPherson. 2008. Clathrin light chains function in mannose phosphate receptor trafficking via regulation of actin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:168-173.
- Powelka, A.M., J. Sun, J. Li, M. Gao, L.M. Shaw, A. Sonnenberg, and V.W. Hsu. 2004. Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic*. 5:20-36.
- Progida, C., L. Cogli, F. Piro, A. De Luca, O. Bakke, and C. Bucci. 2010. Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN. *Journal of cell science*. 123:1480-1491.
- Progida, C., L. Malerod, S. Stuffers, A. Brech, C. Bucci, and H. Stenmark. 2007. RILP is required for the proper morphology and function of late endosomes. *Journal of cell science*. 120:3729-3737.
- Pusapati, G.V., G. Luchetti, and S.R. Pfeffer. 2012. Ric1-Rgp1 complex is a guanine nucleotide exchange factor for the late Golgi Rab6A GTPase and an effector of the medial Golgi Rab33B GTPase. *The Journal of biological chemistry*. 287:42129-42137.
- Qualmann, B., and R.B. Kelly. 2000. Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *The Journal of cell biology*. 148:1047-1062.
- Qualmann, B., D. Koch, and M.M. Kessels. 2011. Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO J*. 30:3501-3515.

- Qualmann, B., J. Roos, P.J. DiGregorio, and R.B. Kelly. 1999. Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Molecular biology of the cell*. 10:501-513.
- Quan, A., and P.J. Robinson. 2013. Syndapin--a membrane remodelling and endocytic F-BAR protein. *FEBS J*. 280:5198-5212.
- Quan, A., and P.J. Robinson. 2014. Repurposing molecular mechanisms of transmitter release: a new job for syndapin at the fusion pore. Focus on "Syndapin 3 modulates fusion pore expansion in mouse neuroendocrine chromaffin cells". *American journal of physiology. Cell physiology*. 306:C792-793.
- Radhakrishna, H., and J.G. Donaldson. 1997. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *The Journal of cell biology*. 139:49-61.
- Rahajeng, J., S.S. Giridharan, B. Cai, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2010a. Important relationships between Rab and MICAL proteins in endocytic trafficking. *World journal of biological chemistry*. 1:254-264.
- Rahajeng, J., S.S. Giridharan, B. Cai, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2012. MICAL-L1 is a tubular endosomal membrane hub that connects Rab35 and Arf6 with Rab8a. *Traffic*. 13:82-93.
- Rahajeng, J., S.S. Giridharan, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2010b. Collapsin response mediator protein-2 (Crmp2) regulates trafficking by linking endocytic regulatory proteins to dynein motors. *The Journal of biological chemistry*. 285:31918-31922.
- Raiborg, C., B. Bremnes, A. Mehlum, D.J. Gillooly, A. D'Arrigo, E. Stang, and H. Stenmark. 2001. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of cell science*. 114:2255-2263.
- Ramachandran, R., M. Surka, J.S. Chappie, D.M. Fowler, T.R. Foss, B.D. Song, and S.L. Schmid. 2007. The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *The EMBO journal*. 26:559-566.
- Rapoport, I., W. Boll, A. Yu, T. Bocking, and T. Kirchhausen. 2008. A motif in the clathrin heavy chain required for the Hsc70/auxilin uncoating reaction. *Molecular biology of the cell*. 19:405-413.
- Rappoport, J.Z., and S.M. Simon. 2009. Endocytic trafficking of activated EGFR is AP-2 dependent and occurs through preformed clathrin spots. *Journal of cell science*. 122:1301-1305.
- Reider, A., S.L. Barker, S.K. Mishra, Y.J. Im, L. Maldonado-Baez, J.H. Hurley, L.M. Traub, and B. Wendland. 2009. Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *The EMBO journal*. 28:3103-3116.
- Reinecke, J.B., D. Katafiasz, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2014. Regulation of Src trafficking and activation by the endocytic regulatory proteins MICAL-L1 and EHD1. *Journal of cell science*. 127:1684-1698.
- Reinecke, J.B., D. Katafiasz, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2015. Novel functions for the endocytic regulatory proteins MICAL-L1 and EHD1 in mitosis. *Traffic*. 16:48-67.
- Ren, X., G.G. Farias, B.J. Canagarajah, J.S. Bonifacino, and J.H. Hurley. 2013. Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1. *Cell*. 152:755-767.

- Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis, and M. Zerial. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*. 122:735-749.
- Ritter, B., J. Modregger, M. Paulsson, and M. Plomann. 1999. PACSIN 2, a novel member of the PACSIN family of cytoplasmic adapter proteins. *FEBS letters*. 454:356-362.
- Roach, W., and M. Plomann. 2007. PACSIN3 overexpression increases adipocyte glucose transport through GLUT1. *Biochem Biophys Res Commun*. 355:745-750.
- Robinson, M.S., and B.M. Pearse. 1986. Immunofluorescent localization of 100K coated vesicle proteins. *The Journal of cell biology*. 102:48-54.
- Rojas, A.M., G. Fuentes, A. Rausell, and A. Valencia. 2012. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *The Journal of cell biology*. 196:189-201.
- Rojas, R., T. van Vlijmen, G.A. Mardones, Y. Prabhu, A.L. Rojas, S. Mohammed, A.J. Heck, G. Raposo, P. van der Sluijs, and J.S. Bonifacino. 2008. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *The Journal of cell biology*. 183:513-526.
- Roland, J.T., A.K. Kenworthy, J. Peranen, S. Caplan, and J.R. Goldenring. 2007. Myosin Vb interacts with Rab8a on a tubular network containing EHD1 and EHD3. *Molecular biology of the cell*. 18:2828-2837.
- Rosenthal, J.A., H. Chen, V.I. Slepnev, L. Pellegrini, A.E. Salcini, P.P. Di Fiore, and P. De Camilli. 1999. The epsins define a family of proteins that interact with components of the clathrin coat and contain a new protein module. *The Journal of biological chemistry*. 274:33959-33965.
- Roth, T.F., and K.R. Porter. 1964. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes Aegypti*. L. *The Journal of cell biology*. 20:313-332.
- Rothberg, K.G., J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney, and R.G. Anderson. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 68:673-682.
- Rothman, J.E. 2014. The principle of membrane fusion in the cell (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 53:12676-12694.
- Rothnie, A., A.R. Clarke, P. Kuzmic, A. Cameron, and C.J. Smith. 2011. A sequential mechanism for clathrin cage disassembly by 70-kDa heat-shock cognate protein (Hsc70) and auxilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:6927-6932.
- Roux, A. 2014. Reaching a consensus on the mechanism of dynamin? *F1000prime reports*. 6:86.
- Roux, A., G. Koster, M. Lenz, B. Sorre, J.B. Manneville, P. Nassoy, and P. Bassereau. 2010. Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:4141-4146.
- Roux, A., K. Uyhazi, A. Frost, and P. De Camilli. 2006. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*. 441:528-531.
- Roxrud, I., C. Raiborg, N.M. Pedersen, E. Stang, and H. Stenmark. 2008. An endosomally localized isoform of Eps15 interacts with Hrs to mediate degradation of epidermal growth factor receptor. *The Journal of cell biology*. 180:1205-1218.

- Rozenblum, G.T., and M. Gimona. 2008. Calponins: adaptable modular regulators of the actin cytoskeleton. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 40:1990-1995.
- Saavedra, L., A. Mohamed, V. Ma, S. Kar, and E.P. de Chaves. 2007. Internalization of beta-amyloid peptide by primary neurons in the absence of apolipoprotein E. *The Journal of biological chemistry*. 282:35722-35732.
- Sabharanjak, S., P. Sharma, R.G. Parton, and S. Mayor. 2002. GPI-anchored proteins are delivered to recycling endosomes via a distinct cdc42-regulated, clathrin-independent pinocytotic pathway. *Developmental cell*. 2:411-423.
- Sakane, A., A.A. Abdallah, K. Nakano, K. Honda, W. Ikeda, Y. Nishikawa, M. Matsumoto, N. Matsushita, T. Kitamura, and T. Sasaki. 2012. Rab13 small G protein and junctional Rab13-binding protein (JRAB) orchestrate actin cytoskeletal organization during epithelial junctional development. *The Journal of biological chemistry*. 287:42455-42468.
- Sakane, A., A. Alamir Mahmoud Abdallah, K. Nakano, K. Honda, T. Kitamura, I. Imoto, N. Matsushita, and T. Sasaki. 2013. Junctional Rab13-binding protein (JRAB) regulates cell spreading via filamins. *Genes Cells*. 18:810-822.
- Sakane, A., K. Honda, and T. Sasaki. 2010. Rab13 regulates neurite outgrowth in PC12 cells through its effector protein, JRAB/MICAL-L2. *Molecular and cellular biology*. 30:1077-1087.
- Salminen, A., and P.J. Novick. 1987. A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell*. 49:527-538.
- Samasilp, P., K. Lopin, S.A. Chan, R. Ramachandran, and C. Smith. 2014. Syndapin 3 modulates fusion pore expansion in mouse neuroendocrine chromaffin cells. *American journal of physiology. Cell physiology*. 306:C831-843.
- Sarantis, H., and S. Grinstein. 2012. Subversion of phagocytosis for pathogen survival. *Cell Host Microbe*. 12:419-431.
- Sauvonnet, N., A. Dujeancourt, and A. Dautry-Varsat. 2005. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *The Journal of cell biology*. 168:155-163.
- Scheffzek, K., C. Klebe, K. Fritz-Wolf, W. Kabsch, and A. Wittinghofer. 1995. Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature*. 374:378-381.
- Scherer, P.E., T. Okamoto, M. Chun, I. Nishimoto, H.F. Lodish, and M.P. Lisanti. 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:131-135.
- Scheuber, A., R. Rudge, L. Danglot, G. Raposo, T. Binz, J.C. Poncer, and T. Galli. 2006. Loss of AP-3 function affects spontaneous and evoked release at hippocampal mossy fiber synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:16562-16567.
- Schlossman, D.M., S.L. Schmid, W.A. Braell, and J.E. Rothman. 1984. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *The Journal of cell biology*. 99:723-733.
- Schmidt, E.F., S.O. Shim, and S.M. Strittmatter. 2008. Release of MICAL autoinhibition by semaphorin-plexin signaling promotes interaction with collapsin response mediator protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:2287-2297.
- Schneider, K., E. Seemann, L. Liebmann, R. Ahuja, D. Koch, M. Westermann, C.A. Hubner, M.M. Kessels, and B. Qualmann. 2014. ProSAP1 and membrane

- nanodomain-associated syndapin I promote postsynapse formation and function. *The Journal of cell biology*. 205:197-215.
- Scita, G., and P.P. Di Fiore. 2010. The endocytic matrix. *Nature*. 463:464-473.
- Seaman, M.N. 2004. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *The Journal of cell biology*. 165:111-122.
- Seaman, M.N. 2012. The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *Journal of cell science*. 125:4693-4702.
- Seaman, M.N., M.E. Harbour, D. Tattersall, E. Read, and N. Bright. 2009. Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *Journal of cell science*. 122:2371-2382.
- Seaman, M.N., E.G. Marcusson, J.L. Cereghino, and S.D. Emr. 1997. Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *The Journal of cell biology*. 137:79-92.
- Seaman, M.N., J.M. McCaffery, and S.D. Emr. 1998. A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *The Journal of cell biology*. 142:665-681.
- Senju, Y., Y. Itoh, K. Takano, S. Hamada, and S. Suetsugu. 2011. Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *J Cell Sci*. 124:2032-2040.
- Shah, M., O.Y. Baterina, Jr., V. Taupin, and M.G. Farquhar. 2013. ARH directs megalin to the endocytic recycling compartment to regulate its proteolysis and gene expression. *The Journal of cell biology*. 202:113-127.
- Shao, Y., W. Akmentin, J.J. Toledo-Aral, J. Rosenbaum, G. Valdez, J.B. Cabot, B.S. Hilbush, and S. Halegoua. 2002. Pincher, a pinocytotic chaperone for nerve growth factor/TrkA signaling endosomes. *The Journal of cell biology*. 157:679-691.
- Sharma, D.K., J.C. Brown, Z. Cheng, E.L. Holicky, D.L. Marks, and R.E. Pagano. 2005. The glycosphingolipid, lactosylceramide, regulates beta1-integrin clustering and endocytosis. *Cancer research*. 65:8233-8241.
- Sharma, M., S.S. Giridharan, J. Rahajeng, N. Naslavsky, and S. Caplan. 2009. MICAL-L1 links EHD1 to tubular recycling endosomes and regulates receptor recycling. *Molecular biology of the cell*. 20:5181-5194.
- Sharma, M., N. Naslavsky, and S. Caplan. 2008. A role for EHD4 in the regulation of early endosomal transport. *Traffic*. 9:995-1018.
- Shi, A., S. Pant, Z. Balklava, C.C. Chen, V. Figueroa, and B.D. Grant. 2007. A novel requirement for *C. elegans* Alix/ALX-1 in RME-1-mediated membrane transport. *Current biology : CB*. 17:1913-1924.
- Shi, L., Q.T. Shen, A. Kiel, J. Wang, H.W. Wang, T.J. Melia, J.E. Rothman, and F. Pincet. 2012. SNARE proteins: one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open. *Science*. 335:1355-1359.
- Shpetner, H.S., J.S. Herskovits, and R.B. Vallee. 1996. A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits. *The Journal of biological chemistry*. 271:13-16.
- Sibarita, J.B. 2005. Deconvolution microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 95:201-243.
- Siebold, C., N. Berrow, T.S. Walter, K. Harlos, R.J. Owens, D.I. Stuart, J.R. Terman, A.L. Kolodkin, R.J. Pasterkamp, and E.Y. Jones. 2005. High-resolution structure of the catalytic region of MICAL (molecule interacting with CasL), a

- multidomain flavoenzyme-signaling molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:16836-16841.
- Simmen, T., S. Honing, A. Icking, R. Tikkanen, and W. Hunziker. 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nature cell biology*. 4:154-159.
- Simpson, F., N.K. Hussain, B. Qualmann, R.B. Kelly, B.K. Kay, P.S. McPherson, and S.L. Schmid. 1999. SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nature cell biology*. 1:119-124.
- Sjoblom, B., A. Salmazo, and K. Djinic-Carugo. 2008. Alpha-actinin structure and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 65:2688-2701.
- Solis, G.P., N. Hulsbusch, Y. Radon, V.L. Katanaev, H. Plattner, and C.A. Stuermer. 2013. Reggies/flotillins interact with Rab11a and SNX4 at the tubulovesicular recycling compartment and function in transferrin receptor and E-cadherin trafficking. *Molecular biology of the cell*. 24:2689-2702.
- Sollner, T., S.W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J.E. Rothman. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 362:318-324.
- Sonnichsen, B., S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf, and M. Zerial. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *The Journal of cell biology*. 149:901-914.
- Sotelo, P., P. Farfan, M.L. Benitez, G. Bu, and M.P. Marzolo. 2014. Sorting nexin 17 regulates ApoER2 recycling and reelin signaling. *PloS one*. 9:e93672.
- Sottile, J., and J. Chandler. 2005. Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process. *Molecular biology of the cell*. 16:757-768.
- Spradling, K.D., A.E. McDaniel, J. Lohi, and B.K. Pilcher. 2001. Epsin 3 is a novel extracellular matrix-induced transcript specific to wounded epithelia. *The Journal of biological chemistry*. 276:29257-29267.
- Stamnes, M.A., and J.E. Rothman. 1993. The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell*. 73:999-1005.
- Steinberg, F., M. Gallon, M. Winfield, E.C. Thomas, A.J. Bell, K.J. Heesom, J.M. Tavare, and P.J. Cullen. 2013. A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nature cell biology*. 15:461-471.
- Steinberg, F., K.J. Heesom, M.D. Bass, and P.J. Cullen. 2012. SNX17 protects integrins from degradation by sorting between lysosomal and recycling pathways. *The Journal of cell biology*. 197:219-230.
- Steinman, R.M., I.S. Mellman, W.A. Muller, and Z.A. Cohn. 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *The Journal of cell biology*. 96:1-27.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:513-525.
- Stern, S.T., P.P. Adiseshiaiah, and R.M. Crist. 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol*. 9:20.
- Stimpson, H.E., C.P. Toret, A.T. Cheng, B.S. Pauly, and D.G. Drubin. 2009. Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Molecular biology of the cell*. 20:4640-4651.
- Stockinger, W., B. Sailler, V. Strasser, B. Recheis, D. Fasching, L. Kahr, W.J. Schneider, and J. Nimpf. 2002. The PX-domain protein SNX17 interacts with

- members of the LDL receptor family and modulates endocytosis of the LDL receptor. *The EMBO journal*. 21:4259-4267.
- Stoeber, M., I.K. Stoeck, C. Hanni, C.K. Bleck, G. Balistreri, and A. Helenius. 2012. Oligomers of the ATPase EHD2 confine caveolae to the plasma membrane through association with actin. *The EMBO journal*. 31:2350-2364.
- Stowell, M.H., B. Marks, P. Wigge, and H.T. McMahon. 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature cell biology*. 1:27-32.
- Suetsugu, S., S. Kurisu, and T. Takenawa. 2014. Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiological reviews*. 94:1219-1248.
- Sumoy, L., R. Pluvinet, N. Andreu, X. Estivill, and M. Escarceller. 2001. PACSIN 3 is a novel SH3 domain cytoplasmic adapter protein of the pacsin-syndapin-FAP52 gene family. *Gene*. 262:199-205.
- Sun, H., H. Dai, J. Zhang, X. Jin, S. Xiong, J. Xu, J. Wu, and Y. Shi. 2006. Solution structure of calponin homology domain of Human MICAL-1. *J Biomol NMR*. 36:295-300.
- Sun, Y., T.T. Chiu, K.P. Foley, P.J. Bilan, and A. Klip. 2014. Myosin Va mediates Rab8A-regulated GLUT4 vesicle exocytosis in insulin-stimulated muscle cells. *Molecular biology of the cell*. 25:1159-1170.
- Sundborger, A.C., and J.E. Hinshaw. 2014. Regulating dynamin dynamics during endocytosis. *F1000prime reports*. 6:85.
- Suzuki, T., T. Nakamoto, S. Ogawa, S. Seo, T. Matsumura, K. Tachibana, C. Morimoto, and H. Hirai. 2002. MICAL, a novel CasL interacting molecule, associates with vimentin. *The Journal of biological chemistry*. 277:14933-14941.
- Swanson, J.A., and C. Watts. 1995. Macropinocytosis. *Trends in cell biology*. 5:424-428.
- Sweitzer, S.M., and J.E. Hinshaw. 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*. 93:1021-1029.
- Tabuchi, M., I. Yanatori, Y. Kawai, and F. Kishi. 2010. Retromer-mediated direct sorting is required for proper endosomal recycling of the mammalian iron transporter DMT1. *Journal of cell science*. 123:756-766.
- Tebar, F., T. Sorkina, A. Sorkin, M. Ericsson, and T. Kirchhausen. 1996. Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *The Journal of biological chemistry*. 271:28727-28730.
- Temkin, P., B. Lauffer, S. Jager, P. Cimermancic, N.J. Krogan, and M. von Zastrow. 2011. SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nature cell biology*. 13:715-721.
- Teo, H., O. Perisic, B. Gonzalez, and R.L. Williams. 2004. ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Developmental cell*. 7:559-569.
- Terai, T., N. Nishimura, I. Kanda, N. Yasui, and T. Sasaki. 2006. JRAB/MICAL-L2 is a junctional Rab13-binding protein mediating the endocytic recycling of occludin. *Molecular biology of the cell*. 17:2465-2475.
- Terman, J.R., T. Mao, R.J. Pasterkamp, H.H. Yu, and A.L. Kolodkin. 2002. MICALs, a family of conserved flavoprotein oxidoreductases, function in plexin-mediated axonal repulsion. *Cell*. 109:887-900.
- Tetlow, A.L., and F. Tamanoi. 2013. The Ras superfamily G-proteins. *Enzymes*. 33 Pt A:1-14.

- Tong, P.Y., and S. Kornfeld. 1989. Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *The Journal of biological chemistry*. 264:7970-7975.
- Touchot, N., P. Chardin, and A. Tavitian. 1987. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84:8210-8214.
- Traer, C.J., A.C. Rutherford, K.J. Palmer, T. Wassmer, J. Oakley, N. Attar, J.G. Carlton, J. Kremerskothen, D.J. Stephens, and P.J. Cullen. 2007. SNX4 coordinates endosomal sorting of TfnR with dynein-mediated transport into the endocytic recycling compartment. *Nature cell biology*. 9:1370-1380.
- Traub, L.M. 2009. Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:583-596.
- Tu-Sekine, B., H. Goldschmidt, and D.M. Raben. 2015. Diacylglycerol, phosphatidic acid, and their metabolic enzymes in synaptic vesicle recycling. *Adv Biol Regul*. 57:147-152.
- Tzaban, S., R.H. Massol, E. Yen, W. Hamman, S.R. Frank, L.A. Lapierre, S.H. Hansen, J.R. Goldenring, R.S. Blumberg, and W.I. Lencer. 2009. The recycling and transcytotic pathways for IgG transport by FcRn are distinct and display an inherent polarity. *The Journal of cell biology*. 185:673-684.
- Ullrich, O., S. Reinsch, S. Urbe, M. Zerial, and R.G. Parton. 1996. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol*. 135:913-924.
- Umasankar, P.K., S. Sanker, J.R. Thieman, S. Chakraborty, B. Wendland, M. Tsang, and L.M. Traub. 2012. Distinct and separable activities of the endocytic clathrin-coat components Fcho1/2 and AP-2 in developmental patterning. *Nature cell biology*. 14:488-501.
- Ungewickell, E., and D. Branton. 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature*. 289:420-422.
- Ungewickell, E., and H. Ungewickell. 1991. Bovine brain clathrin light chains impede heavy chain assembly in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 266:12710-12714.
- Ungewickell, E., H. Ungewickell, S.E. Holstein, R. Lindner, K. Prasad, W. Barouch, B. Martin, L.E. Greene, and E. Eisenberg. 1995. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*. 378:632-635.
- Valdez, G., W. Akmentin, P. Philippidou, R. Kuruvilla, D.D. Ginty, and S. Halegoua. 2005. Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:5236-5247.
- van der Sluijs, P., M. Hull, P. Webster, P. Male, B. Goud, and I. Mellman. 1992. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*. 70:729-740.
- van Meel, E., and J. Klumperman. 2008. Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system. *Histochem Cell Biol*. 129:253-266.
- Vinten, J., A.H. Johnsen, P. Roepstorff, J. Harpoth, and J. Tranum-Jensen. 2005. Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae. *Biochimica et biophysica acta*. 1717:34-40.

- Voglmaier, S.M., K. Kam, H. Yang, D.L. Fortin, Z. Hua, R.A. Nicoll, and R.H. Edwards. 2006. Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron*. 51:71-84.
- Vonderheit, A., and A. Helenius. 2005. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol*. 3:e233.
- Walseng, E., O. Bakke, and P.A. Roche. 2008. Major histocompatibility complex class II-peptide complexes internalize using a clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway. *The Journal of biological chemistry*. 283:14717-14727.
- Wang, J., Y. Wang, and T.J. O'Halloran. 2006a. Clathrin light chain: importance of the conserved carboxy terminal domain to function in living cells. *Traffic*. 7:824-832.
- Wang, Y., Z. Dai, W. Sadee, and W.S. Hancock. 2006b. A pharmacoproteomics study of the cancer cell line EKVX using capillary-LC/MS/MS. *Mol Pharm*. 3:566-578.
- Wang, Y.J., J. Wang, H.Q. Sun, M. Martinez, Y.X. Sun, E. Macia, T. Kirchhausen, J.P. Albanesi, M.G. Roth, and H.L. Yin. 2003. Phosphatidylinositol 4 Phosphate Regulates Targeting of Clathrin Adaptor AP-1 Complexes to the Golgi. *Cell*. 114:299-310.
- Wang, Z., J.G. Edwards, N. Riley, D.W. Provance, Jr., R. Karcher, X.D. Li, I.G. Davison, M. Ikebe, J.A. Mercer, J.A. Kauer, and M.D. Ehlers. 2008. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell*. 135:535-548.
- Wasiak, S., V. Legendre-Guillemain, R. Puertollano, F. Blondeau, M. Girard, E. de Heuvel, D. Boismenu, A.W. Bell, J.S. Bonifacino, and P.S. McPherson. 2002. Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *The Journal of cell biology*. 158:855-862.
- Wassmer, T., N. Attar, M.V. Bujny, J. Oakley, C.J. Traer, and P.J. Cullen. 2007. A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *Journal of cell science*. 120:45-54.
- Wassmer, T., N. Attar, M. Harterink, J.R. van Weering, C.J. Traer, J. Oakley, B. Goud, D.J. Stephens, P. Verkade, H.C. Korswagen, and P.J. Cullen. 2009. The retromer coat complex coordinates endosomal sorting and dynein-mediated transport, with carrier recognition by the trans-Golgi network. *Developmental cell*. 17:110-122.
- Way, M., and R.G. Parton. 1996. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS letters*. 378:108-112.
- Weide, T., J. Teuber, M. Bayer, and A. Barnekow. 2003. MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 306:79-86.
- Weigert, R., A.C. Yeung, J. Li, and J.G. Donaldson. 2004. Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Molecular biology of the cell*. 15:3758-3770.
- Welz, T., J. Wellbourne-Wood, and E. Kerkhoff. 2014. Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends in cell biology*. 24:407-415.
- Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*. 118:843-846.
- Wilbur, J.D., C.Y. Chen, V. Manalo, P.K. Hwang, R.J. Fletterick, and F.M. Brodsky. 2008. Actin binding by Hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and Hip1R (Hip1-

- related protein) is regulated by clathrin light chain. *The Journal of biological chemistry*. 283:32870-32879.
- Wilbur, J.D., P.K. Hwang, J.A. Ybe, M. Lane, B.D. Sellers, M.P. Jacobson, R.J. Fletterick, and F.M. Brodsky. 2010. Conformation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly. *Developmental cell*. 18:841-848.
- Williamson, M.P. 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *The Biochemical journal*. 297 (Pt 2):249-260.
- Wolf, E., P.S. Kim, and B. Berger. 1997. MultiCoil: a program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Sci*. 6:1179-1189.
- Wollert, T., and J.H. Hurley. 2010. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*. 464:864-869.
- Wu, Y., E.T. O'Toole, M. Girard, B. Ritter, M. Messa, X. Liu, P.S. McPherson, S.M. Ferguson, and P. De Camilli. 2014. A dynamin 1-, dynamin 3- and clathrin-independent pathway of synaptic vesicle recycling mediated by bulk endocytosis. *Elife*. 3:e01621.
- Xie, S., N. Naslavsky, and S. Caplan. 2014. Diacylglycerol kinase alpha regulates tubular recycling endosome biogenesis and major histocompatibility complex class I recycling. *The Journal of biological chemistry*. 289:31914-31926.
- Xing, Y., T. Bocking, M. Wolf, N. Grigorieff, T. Kirchhausen, and S.C. Harrison. 2010. Structure of clathrin coat with bound Hsc70 and auxilin: mechanism of Hsc70-facilitated disassembly. *The EMBO journal*. 29:655-665.
- Yamabhai, M., N.G. Hoffman, N.L. Hardison, P.S. McPherson, L. Castagnoli, G. Cesareni, and B.K. Kay. 1998. Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *The Journal of biological chemistry*. 273:31401-31407.
- Yamada, E. 1955. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*. 1:445-458.
- Yamamoto, Y., N. Nishimura, S. Morimoto, H. Kitamura, S. Manabe, H.-o. Kanayama, S. Kagawa, and T. Sasaki. 2003. Distinct roles of Rab3B and Rab13 in the polarized transport of apical, basolateral, and tight junctional membrane proteins to the plasma membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 308:270-275.
- Yamamura, R., N. Nishimura, H. Nakatsuji, S. Arase, and T. Sasaki. 2008. The interaction of JRAB/MICAL-L2 with Rab8 and Rab13 coordinates the assembly of tight junctions and adherens junctions. *Molecular biology of the cell*. 19:971-983.
- Yamashita, Y., K. Kojima, T. Tsukahara, H. Agawa, K. Yamada, Y. Amano, N. Kurotori, N. Tanaka, K. Sugamura, and T. Takeshita. 2008. Ubiquitin-independent binding of Hrs mediates endosomal sorting of the interleukin-2 receptor beta-chain. *Journal of cell science*. 121:1727-1738.
- Yao, G., X. Su, V. Nguyen, K. Roberts, X. Li, A. Takakura, M. Plomann, and J. Zhou. 2014. Polycystin-1 regulates actin cytoskeleton organization and directional cell migration through a novel PC1-Pacsin 2-N-Wasp complex. *Hum Mol Genet*. 23:2769-2779.
- Yap, C.C., Z.M. Lasiacka, S. Caplan, and B. Winckler. 2010. Alterations of EHD1/EHD4 protein levels interfere with L1/NgCAM endocytosis in neurons and disrupt axonal targeting. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:6646-6657.

- Ybe, J.A., B. Greene, S.H. Liu, U. Pley, P. Parham, and F.M. Brodsky. 1998. Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges. *The EMBO journal*. 17:1297-1303.
- Yoshimura, S., A. Gerondopoulos, A. Linford, D.J. Rigden, and F.A. Barr. 2010. Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. *The Journal of cell biology*. 191:367-381.
- Yu, I.M., and F.M. Hughson. 2010. Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 26:137-156.
- Zahraoui, A. 2005. Properties of Rab13 Interaction with Protein Kinase A. 403:723-732.
- Zahraoui, A. 2014. MICAL-like1 in endosomal signaling. *Methods in enzymology*. 535:419-437.
- Zahraoui, A., G. Joberty, M. Arpin, J.J. Fontaine, R. Hellio, A. Tavitian, and D. Louvard. 1994. A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*. 124:101-115.
- Zahraoui, A., N. Touchot, P. Chardin, and A. Tavitian. 1989. The human Rab genes encode a family of GTP-binding proteins related to yeast YPT1 and SEC4 products involved in secretion. *The Journal of biological chemistry*. 264:12394-12401.
- Zaremba, S., and J.H. Keen. 1983. Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *The Journal of cell biology*. 97:1339-1347.
- Zerial, M., and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:107-117.
- Zhang, B., Y.H. Koh, R.B. Beckstead, V. Budnik, B. Ganetzky, and H.J. Bellen. 1998. Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron*. 21:1465-1475.
- Zhang, F., Z. Wang, M. Lu, Y. Yonekubo, X. Liang, Y. Zhang, P. Wu, Y. Zhou, S. Grinstein, J.F. Hancock, and G. Du. 2014. Temporal production of the signaling lipid phosphatidic acid by phospholipase D2 determines the output of extracellular signal-regulated kinase signaling in cancer cells. *Molecular and cellular biology*. 34:84-95.
- Zhang, P., Y. Wu, T.Y. Belenkaya, and X. Lin. 2011. SNX3 controls Wingless/Wnt secretion through regulating retromer-dependent recycling of Wntless. *Cell Res*. 21:1677-1690.
- Zhou, Y., Y. Adolfs, W.W. Pijnappel, S.J. Fuller, R.C. Van der Schors, K.W. Li, P.H. Sugden, A.B. Smit, A. Hergovich, and R.J. Pasterkamp. 2011. MICAL-1 is a negative regulator of MST-NDR kinase signaling and apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 31:3603-3615.
- Zhu, Y., M.T. Drake, and S. Kornfeld. 1999. ADP-ribosylation factor 1 dependent clathrin-coat assembly on synthetic liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:5013-5018.
- Zhuo, Y., K.E. Cano, L. Wang, U. Ilangovan, A.P. Hinck, R. Sousa, and E.M. Lafer. 2015. Nuclear Magnetic Resonance Structural Mapping Reveals Promiscuous Interactions between Clathrin-Box Motif Sequences and the N-Terminal Domain of the Clathrin Heavy Chain. *Biochemistry*. 54:2571-2580.
- Zimmermann, P., Z. Zhang, G. Degeest, E. Mortier, I. Leenaerts, C. Coomans, J. Schulz, F. N'Kuli, P.J. Courtoy, and G. David. 2005. Syndecan recycling

[corrected] is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. *Developmental cell*. 9:377-388.