

# Mécanismes de régulation du facteur d'échange EFA6

## A. Introduction

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, les récepteurs couplés aux protéines G, suite à leur activation par leur ligand spécifique vont contrôler plusieurs voies de signalisation par l'intermédiaire de leurs protéines G hétérotrimériques. Cependant, afin que cette activation et la cascade de signalisation induite ne perdurent pas dans la cellule, les RCPGs activés vont être internalisés. Une fois internalisés les récepteurs vont être emmenés au niveau de compartiments intracellulaires endosomaux. Ils vont pouvoir être ensuite soit recyclés rapidement vers la membrane plasmique à partir des endosomes précoces, soit plus tardivement à partir des endosomes de recyclage. Sous stimulation prolongée par un agoniste ces récepteurs vont être dirigés vers les lysosomes et la voie de dégradation. La signalisation de ces récepteurs est un processus finement régulé au sein de la cellule. Cette régulation fait tout d'abord intervenir une protéine kinase de la famille des GRK. Les GRKs appartiennent à la famille des Sérine/Thréonine kinases et vont phosphoryler les RCPGs suite à leur activation. Cette phosphorylation va permettre d'augmenter l'affinité de ces récepteurs avec un deuxième acteur clé de leur désensibilisation : les arrestines. Les  $\beta$ -arrestines, qui sont ubiquitaires, ainsi recrutées vont permettre dans un premier temps le découplage entre le récepteur et les protéines G hétérotrimériques. Dans un deuxième temps les  $\beta$ -arrestines vont permettre le couplage des récepteurs à internaliser avec la machinerie d'endocytose. En effet grâce à la libération de leur extrémité C-terminal induite par l'interaction avec les RCPGs activés, elles sont capables d'interagir avec la protéine adaptatrice AP-2 et la clathrine et ainsi permettre le recrutement des RCPGs dans les puits recouverts de clathrine. Une étude menée au laboratoire a également mis en évidence que les  $\beta$ -arrestines, via leur domaine C-terminal, interagissent de manière simultanée avec EFA6 et Arf6-GDP suite à l'activation du récepteur  $\beta$ 2-adrénérique. Cette interaction est dépendante du ligand et facilite l'activation d'Arf6 par EFA6.

Pendant la dernière partie de ma thèse je me suis donc intéressée à la régulation des interactions protéine-protéine dans ce complexe à trois partenaires que sont EFA6, Arf6 et la

$\beta$ -arrestine afin de mieux comprendre le rôle d'EFA6 et d'Arf6 dans le processus d'internalisation.

## **B. Matériel et méthodes**

### **1. Culture cellulaire et transfection**

Les cellules BHK-21 (Baby Hamster Kidney) sont cultivées dans du milieu de culture BHK-21 (Gibco-BRL), contenant 5% de sérum de veau foetal, 10% de tryptose phosphate broth, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 2 mM de L-glutamine.

Ces cellules sont ensuite transfectées transitoirement avec les plasmides codant pour les protéines d'intérêt à l'aide des agents de transfection Jet Pei (Polyplus transfection, Illkirch, France) ou Fugene 6 (Roche) comme décrit par les fournisseurs.

### **2. Réactifs et anticorps**

Le GTPγS [<sup>35</sup>S] provient de Perkin Elmer et les Azolectines de Sigma Chemical (St Louis, MO).

Les anticorps suivant ont été utilisés: l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope VSV-G (clone P5D4; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope HA (clone 12CA5; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), l'antisérum de lapin contre la GFP (Clontech), l'anticorps monoclonal de souris anti-His (Sigma), l'anticorps monoclonal de souris anti-Arf6 (clone 8A6-2 fourni par S. Bourgoin, Sainte-Foy, Canada). L'anticorps de chèvre anti-βarrestine1 (K16 and C19) et anti-βarrestine2 (C18) proviennent de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Heidelberg). L'anticorps secondaire couplé à la Texas-Red vient de Jackson ImmunoResearch (Interchim, France).

### **3. Construction ADN**

Les plasmides codant pour le récepteur β2-adrénergique étiqueté GFP et la βarrestin1 nous ont été fournis par C. Moore et J. Benovic (Université Thomas Jefferson, Philadelphie). Les plasmides codant pour les constructions His-PH-C-ter, les différentes constructions d'EFA6 étiquetées vsv-G, GFP-PH-C-ter, GFP-C-ter, His-Arf6 et His-Arf1 ont été précédemment décrits. Les séquences codant les résidus d'EFA6A humain 1-645 (protéine entière); 125-347 (Sec7); 351-645 (PH-Cter); 490-645 (Cter); 490-525 (ProN); 525-600 (CC); 600-645 (ProC);

490-600 (ProN-CC) et 525-645 (CC-ProC) ont été obtenus par PCR et clonés dans un vecteur pGEX-3X (GE Healthcare) pour fusion avec la GST au niveau de l'extrémité N-terminale.

#### 4. Production et purification de protéines GST et HisTag

Les différentes constructions couplées à la GST ou possédant une étiquette His sont produites dans des bactéries BL21. Le culot bactérien est récupéré puis resuspendu dans du tampon de lyse froid (Tris pH8 50mM ; NaCl 150mM ; MgCl<sub>2</sub> 2mM; glycérol 10% [phenylmethylsulphonyl fluoride] PMSF 0.25mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases pour les GST et Tris pH8 50mM ; NaCl 100mM ; MgCl<sub>2</sub> 1mM; βmercapto ethanol 5mM; glycérol 10%, imidazole 50mM, [phenylmethylsulphonyl fluoride] PMSF 0.25mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases pour les His. La suspension bactérienne est soumise à 2 passages à la Presse de French maintenue à 4°C afin de lyser les bactéries, puis centrifugée. Le surnageant est récupéré et ultracentrifugé à 35.000 rpm pendant 2h à 4°C. Après récupération, le surnageant est incubé avec des billes de Glutathion Sepharose (GST) ou des billes Ni-NTA (His) sur la nuit. Le lendemain les billes sont lavées 3 fois avec du tampon de lyse puis les protéines sont éluées avec du tampon d'éluion (tampon de lyse complété avec de la Glutathion Sepharose 20mM et NaCl 100mM pour les GST et tampon de lyse avec 200mM imidazole pour les His). 6 fractions de 1ml sont collectées puis analysées sur gel de poly-acrylamide et les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. Les fractions contenant la protéine sont dialysées afin d'éliminer le Glutathion Sepharose puis centrifugées sur Centricon pour concentrer les protéines.

#### 5. Pull down sur lysat cellulaire

Après 24h de transfection, les cellules BHK,ensemencées à  $2 \cdot 10^5$  cellules dans des boites de Pétri de diamètre 10cm, sont lavées en PBS à froid, lysées par un tampon de pull-down (Tris/HCl pH=8,0 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 100mM, Triton X100 1%, glycérol 10%, DTT 2mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases) puis centrifugées 10min à 13200rpm à 4°C. Le lysat cellulaire ainsi obtenu est incubé avec 1µM à 3µM de protéines purifiées étiquetées GST, 0,75% de BSA et des billes de Glutathion Sepharose. Le mélange est ainsi mis sous agitation à 4°C pendant 15h. Les billes sont ensuite lavées deux fois en tampon de lyse puis une fois en PBS et les protéines éluées dans 30µl de tampon dénaturant. Les échantillons

sont mis à bouillir pendant 5min puis déposés sur gel de polyacrylamide et l'interaction des protéines est analysée par western-blot avec les anticorps correspondants.

## 6. Fractionnement cytosol/membrane

Après 24h de transfection, les cellules BHK,ensemencées à  $2.10^5$  cellules dans des boites de Pétri de diamètre 10cm sont lavées en PBS. Elles sont ensuite récoltées dans 2ml de PBS puis mises à centrifuger 5 minutes à 1500 rpm à 4°C. Puis le culot cellulaire est homogénéisé 5 minutes à 4°C dans un tampon contenant 250 mM de sucrose, 3 mM d'imidazole, pH 7.4, et un mélange d'inhibiteurs de protéases et centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu dans 100µl de tampon d'homogénéisation à l'aide d'une aiguille 0,6 afin de lyser les cellules puis le lysat est mis à centrifuger pendant 5 minutes à 4500rpm à 4°C. Le surnageant dépourvu de noyau PNS (post-nuclear supernatant) est collecté puis ultra-centrifugé dans un rotor Beckman TLA 100.1 pendant 45 minutes à 70000 rpm à 4°C pour séparer les fractions cytosoliques et membranaires. Le surnageant correspondant à la fraction cytosolique est collecté et le culot correspondant à la fraction membranaire est resuspendu dans un volume équivalent. Les échantillons sont ensuite bouillis pendant 5 minutes puis déposés sur gel de polyacrylamide et enfin analysés par coloration au bleu de Coomassie ou par western-blot.

## 7. Sédimentation

3µM de vésicules d'azolectine sont incubées avec 2 à 3 µM de protéines Arf6 gly GDP ou GTP et His-PH-C-ter seul ou ensemble dans un tampon HKM pH 7.5 (Hepes 50mM, KCl 100mM et MgCl<sub>2</sub> 2mM). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les 70µl de mélange sont mis à centrifuger dans un rotor Beckman TLA 100.1 pendant 13 minutes à 70000 rpm à 25°C. Le surnageant et le culot qui a été resuspendu dans 70µl de tampon HKM sont mis à bouillir pendant 5min puis déposés sur gel de polyacrylamide puis analysés par coloration au bleu de Coomassie ou par western-blot.

## 8. Pull down protéines purifiées

De 0,5µM à 3µM de protéines purifiées possédant une étiquette poly-Histidine sont incubées dans un tampon de lyse (Tris/HCl pH=8,0 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 100mM, Triton X100 1%, glycérol 10%, DTT 2mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases) avec 3µM

de protéines purifiées couplées à une GST, 0,75% de BSA ainsi que des billes de Glutathion Sepharose pendant 2h30 à 4°C sous agitation. Enfin les billes sont lavées deux fois en tampon de pull-down puis une fois en PBS et les protéines éluées dans 30µl de tampon dénaturant. Les échantillons sont mis à bouillir pendant 5 minutes puis déposés sur gel de polyacrylamide et l'interaction des protéines est analysée par western-blot avec les anticorps correspondants.

#### 9. Cinétiques d'échange nucléotidique radioactif sur les Arf

1,4µM de protéines Arf6 ou Arf1 sont pré-incubées dans un tampon HKM (Hepes 50mM pH 7,5, KCl 100mM et MgCl<sub>2</sub> 1mM) en présence d'azolectine avec 2mM EDTA et 0,5 à 10µM des différentes protéines d'intérêt (GST-C-ter ; GST PH-C-ter et βarrestine) pendant 15 min à température ambiante. La cinétique d'échange spontanée est déclenchée par l'ajout de 100µM de nucléotides radioactifs GTPγS [<sup>35</sup>S] et le mélange est placé à 37°C. Pour chaque temps une aliquote du mélange est prélevé et filtré sur membrane de nitrocellulose afin de déterminer la quantité de protéines Arf liées au GTPγS [<sup>35</sup>S] exprimée en cpm (coups par minute).

Pour l'échange catalysé, la protéine Arf6 (1,4µM) est pré-incubée dans un tampon HKM en présence d'azolectine avec 50nM d'His-EFA6 et/ou 10µM de GST-C-ter pendant 15 minutes à température ambiante. La cinétique est déclenchée par l'ajout de 100µM de nucléotides radioactifs GTPγS [<sup>35</sup>S] et le mélange est placé à 37°C. Pour chaque temps un aliquote du mélange est prélevé et filtré sur membrane de nitrocellulose afin de déterminer la quantité de protéines Arf liées au GTPγS [<sup>35</sup>S] exprimée en cpm (coups par minute).

#### 10. Western blot

Une fois les protéines dénaturées, elles sont séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dans du tampon de migration (Tris 25mM ; Glycine 250 mM; SDS 1%). Suite à la séparation électrophorétique à 27mA constant, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose dans du tampon de transfert (Tris 25Mm; Glycine 192 mM; méthanol 20%) à 4°C pendant 90 minutes à 400mA constant. Un système de transfert liquide est utilisé. La membrane de nitrocellulose (Whatman, Protran, Germany) est saturée pendant 30 minutes dans un tampon PBS contenant 5% de lait écrémé en poudre et 0,1% de Tween 20, à température ambiante et sous agitation. Puis elle est incubée, soit deux heures

à température ambiante, soit durant la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dirigé contre notre protéine d'intérêt. L'anticorps est dilué dans du PBS et du lait à 5%. Une fois l'incubation terminée, la membrane est lavée 4 fois pendant 10 minutes dans du PBSTween et incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la horse-radish peroxydase durant une heure à température ambiante. La membrane est lavée 4 fois pendant 10 minutes et révélée par chemiluminescence (Millipore) associée à un système d'acquisition numérique (LAS-3000, Fuji) et analysée à l'aide d'un logiciel adapté (MultiGauge, Fuji).

#### 11. Préparation liposomes

De larges vésicules unilamellaires d'azolectine ont été préparées comme décrit précédemment à une concentration de 20mg/ml.

#### 12. Immunofluorescence

Les cellules BHK sontensemencées sur des lamelles de 11mm de diamètre puis transfectées transitoirement avec les plasmides codant pour C-ter Q600-GFP et/ou vsv-G-EFA6 ou V525-GFP et/ou Arf6-HA. Après 24h de transfection les cellules sont lavées en PBS, fixées en 3% PFA (paraformaldéhyde) pendant 20min, lavées à nouveau et incubées 10 minutes avec du NH4Cl 50mM. Ensuite les cellules sont perméabilisées par la saponine 0,5% et incubées successivement avec les anticorps primaires et secondaires pendant 30min à température ambiante. Vsv-G-EFA6 et Arf6-HA sont révélées par des anticorps monoclonaux spécifiques de souris (P5D4 et 12CA5 respectivement). Les anticorps secondaires couplés au fluorochrome Texas-Red permettent ensuite de visualiser les protéines. Les lamelles sont ensuite montées sur lame puis l'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocale LSM780 (Zeiss).

## C. Résultats

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'interaction entre EFA6 et la  $\beta$ -arrestine. Par des expériences de pull-down nous avons voulu déterminer le domaine d'EFA6 impliqué dans cette interaction. Pour cela nous avons utilisé différentes constructions d'EFA6 couplé à la GST: soit la protéine entière, soit les domaines Sec7, C-terminal ou PH-C-terminal isolés (Figure 39A). Ces expériences mettent en évidence que le domaine C-terminal de la  $\beta$ -arrestine est capable d'interagir légèrement avec EFA6 entier et de manière plus importante avec le domaine C-terminal. De manière surprenante on remarque que le domaine PH-C-terminal, qui possède pourtant le domaine C-terminal responsable de l'interaction, n'est pas capable d'interagir avec la  $\beta$ -arrestine (Figure 39B et 39C).

Cette différence d'interaction entre ces deux constructions qui contiennent le domaine C-terminal identifié comme étant le domaine interagissant avec la  $\beta$ -arrestine suggère que le site d'interaction est masqué par la présence du domaine PH.

Ces résultats nous ont amenés à l'hypothèse selon laquelle EFA6 serait capable de former des homodimères. En effet nous pouvons imaginer qu'EFA6 serait capable de se dimériser par l'intermédiaire d'une interaction entre le domaine C-terminal et le domaine PH empêchant ainsi la liaison de la  $\beta$ -arrestine.

Dans le but de tester cette hypothèse nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation sur des cellules surexprimant la protéine EFA6 couplée à deux étiquettes différentes. Nous avons pu observer que la protéine EFA6 portant une étiquette GFP n'était pas capable d'immunoprécipiter avec elle la protéine EFA6 couplée à la RFP et inversement. Cette constatation a été confortée par des expériences de gel filtration réalisées par l'équipe du Dr Cherfils, où la présence d'homodimères d'EFA6 n'a pu être observée (communication personnelle).

Ces observations suggèrent fortement la présence d'un repli intramoléculaire au sein de la protéine EFA6 masquant ainsi le site d'interaction présent au niveau du domaine C-terminal pour la  $\beta$ -arrestine.

Dans le but de valider cette hypothèse et nous avons cherché tout d'abord à confirmer cette interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6.

Pour cela nous avons réalisé des expériences de pull-down sur des lysats cellulaires surexprimant soit EFA6 entier soit différents mutants de délétion en présence de GST ou de

GST-C-ter. Ces expériences ont mis en évidence que le domaine C-terminal d'EFA6 est capable d'interagir avec toutes les constructions d'EFA6 contenant le domaine PH. En effet on constate que le domaine C-terminal est capable de précipiter avec lui les constructions EFA6 entier, EFA6 $\Delta$ Sec7 et EFA6 $\Delta$ Cter mais pas la construction EFA6 $\Delta$ PHCter (Figure 40). Ces résultats mettent en évidence que la présence du domaine PH est nécessaire pour l'interaction avec le domaine C-terminal et suggèrent une interaction entre le domaine C-terminal et le domaine PH d'EFA6.

Nous avons, par la suite, effectué une expérience de pull down sur un lysat cellulaire surexprimant le domaine PH d'EFA6. Nous avons pu observer que le domaine C-terminal couplé à la GST est capable de précipiter avec lui le domaine PH alors que la GST seule ne peut pas (Figure 41A). Ces résultats nous ont permis de confirmer l'interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6. Dans une expérience complémentaire nous avons utilisé la propriété du domaine PH à se lier aux phospholipides membranaires alors que le domaine C-terminal se trouve majoritairement dans le cytosol. Nous avons donc réalisé un fractionnement cytosol membrane sur des cellules surexprimant soit le domaine PH, soit le domaine C-terminal soit ces deux domaines. Ainsi nous avons pu observer que le domaine PH se trouve majoritairement dans la fraction liée aux membranes alors que le domaine C-terminal se trouve lui dans la fraction cytosolique. Quand ces deux constructions sont co-transfectées on observe une redistribution d'une fraction du domaine C-terminal de la fraction cytosolique vers la fraction liée aux membranes (Figure 41B). Ces résultats démontrent une interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6 et que cette interaction n'est pas compétitive avec la liaison du domaine PH aux phospholipides. En effet la présence du domaine C-terminal n'est pas capable de dissocier la liaison du domaine PH aux membranes. La capacité du domaine PH à lier simultanément les lipides et le domaine C-terminal suggère que l'ouverture de ce repli intramoléculaire ne régule probablement pas la liaison d'EFA6 à la membrane plasmique.

Par la suite nous avons voulu réduire la zone d'interaction et identifier quelle zone du domaine C-terminal est impliquée dans l'interaction avec le PH. Le domaine C-terminal est composé de deux domaines riches en proline (ProN et ProC) séparés par un domaine coiled-coil (CC). Nous avons réalisé et purifié au laboratoire différentes constructions correspondant aux différents sous domaines du C-terminal couplés à la GST (Figure 41C). Par des expériences de pull-down sur des lysats cellulaires surexprimant le domaine PH d'EFA6,

nous avons pu mettre en évidence que le ProN-CC, mais pas le domaine CC-ProC, est capable d'interagir avec le domaine PH (Figure 41D). Nous avons confirmé ce résultat par une expérience de fractionnement sur des cellules BHK surexprimant les domaines PH et ProN-CC (C-ter Q600) seuls ou ensemble. Ainsi, nous avons observé, de manière similaire au domaine C-terminal, que le domaine ProN-CC est majoritairement soluble quand il est exprimé seul et est en partie redistribué dans la fraction membranaire par le domaine PH (Figure 41E). Nous avons également observé que le domaine ProN seul n'est pas redistribué dans la fraction membranaire avec le domaine PH (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que la combinaison des domaines ProN et CC est nécessaire pour l'interaction avec le domaine PH.

Nous avons également cherché à déterminer si cette interaction était possible dans la cellule. Pour cela nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence sur des cellules BHK surexprimant EFA6 et une partie du domaine C-ter s'arrêtant au résidu Q600 qui correspond au domaine ProN-CC, seuls ou ensemble afin d'étudier leurs localisations. Nous pouvons observer que le domaine ProN-CC (C-ter Q600) a un marquage diffus qui traduit une localisation dans le cytoplasme. Ces résultats sont en accord avec les expériences de fractionnement cytosol/membrane où on retrouvait le domaine C-ter dans la fraction soluble. EFA6, quant à elle, se localise exclusivement à la membrane plasmique et plus précisément dans des replis membranaires appelés «ruffles». Lors de la double transfection nous observons qu'EFA6 garde sa localisation à la membrane plasmique alors que le domaine ProN-CC se trouve en partie redistribué dans les structures enrichies en EFA6 (Figure 42). Ces expériences mettent en évidence qu'EFA6 et le C-terminal sont capables d'interagir au niveau de la membrane plasmique dans la cellule.

Nous avons donc pu mettre en évidence jusqu'ici que le domaine C-terminal d'EFA6 était capable d'interagir via son domaine ProN avec le domaine PH. Nous avons vu que cette interaction masque les sites d'interaction présents au niveau du domaine C-terminal pour au moins un de ces partenaires, la  $\beta$ -arrestine, mais n'interfère pas avec la liaison du domaine PH avec les membranes. L'ensemble de ces résultats suggère fortement la présence d'un repli intramoléculaire au sein du facteur d'échange EFA6.

Durant la suite de ce projet nous nous sommes penchés sur les mécanismes de régulation d'EFA6 et avons cherché à déterminer les facteurs impliqués dans cette régulation et dans l'ouverture de la protéine EFA6. En effet il a été décrit chez ARNO la présence de deux replis

intramoléculaires le maintenant dans une conformation inactive. L'ouverture de la protéine fait intervenir différents facteurs dont des phosphorylations et Arf6-GTP, est nécessaire pour obtenir une forme d'ARNO pleinement active. Par analogie avec le facteur d'échange ARNO nous avons étudié le rôle d'Arf6 dans cette régulation.

Dans ce but nous avons réalisé une expérience de sédimentation. Nous avons incubé des vésicules avec du PH-C-ter, de l'Arf6gly-GTP qui correspond à une forme non myristylée donc soluble, ou la combinaison de ces deux protéines et les avons fait sédimenter. Ainsi les protéines associées aux membranes vont se retrouver entraînées dans le culot avec les vésicules. Nous observons dans cette expérience qu'Arf6gly-GTP et le PH-C-ter, comme attendu, se trouvent respectivement dans le surnageant et dans le culot. De plus quand ces deux protéines sont incubées ensemble, nous constatons, comme mentionné précédemment dans l'étude réalisée en collaboration avec le Dr Cherfils, qu'une petite fraction d'Arf6gly-GTP sédimente avec les vésicules montrant une légère interaction entre ces deux partenaires (Figure 43). Nous avons ensuite cherché à déterminer si cette interaction est nucléotide dépendante et avons réalisé cette expérience en présence également d'Arf6-GDP. Comme pour Arf6-GTP nous observons qu'une fraction d'Arf6-GDP est redistribuée dans le culot en présence de PH-C-ter. Ces résultats confirment une interaction entre le PH-C-Ter et Arf6. Cette interaction semble être spécifique des nucléotides puisque nous constatons que la fraction relocalisée est plus importante pour la forme GDP que pour la forme GTP (Figure 44).

Par la suite nous avons voulu déterminer si cette interaction se fait par l'intermédiaire du domaine C-terminal ou du domaine PH. Pour cela nous avons réalisé des expériences de pull-down en solution à l'aide de protéines purifiées. Nous avons testé l'interaction entre les formes GDP et GTP d'Arf6 et les domaines C-terminal et PH-C-terminal. On observe dans ces conditions plus stringentes, où la composition en sels est différente et où le pH augmenté, que nous ne retrouvons pas les résultats obtenus précédemment. En effet nous constatons ici que la forme GTP d'Arf6 n'est capable d'interagir ni avec le domaine C-terminal ni avec le domaine PH-C-terminal. En revanche la forme GDP elle, interagit faiblement avec le domaine PH-C-terminal et de manière plus forte avec le domaine C-terminal (Figure 45). L'ensemble de ces résultats mettent en évidence une interaction entre EFA6 et son substrat se faisant par un autre domaine que le domaine catalytique. En effet nous avons pu constater la présence d'un site d'interaction présent sur le domaine C-terminal pour la petite protéine G

Arf6, et plus spécifiquement pour la forme GDP. De manière similaire à la  $\beta$ -arrestine, ce site d'interaction est masqué par la présence du domaine PH.

Cette interaction entre le domaine C-terminal et Arf6 étant spécifique du nucléotide, nous avons cherché à déterminer son rôle sur l'échange nucléotidique d'Arf6. Bien que l'échange nucléotidique d'Arf6 soit catalysé par EFA6, la réaction peut se faire plus lentement de manière spontanée. La diminution de la concentration du  $MgCl_2$  libre dans le milieu va accélérer cette réaction en déstabilisant le GDP favorisant ainsi la liaison du GTP $\gamma$ S en excès dans le milieu. Ainsi nous avons pu étudier les effets des domaines C-terminal et PH-C-terminal sur cet échange spontané. Nous avons pu constater que la présence du PH-C-terminal n'influence pas l'échange nucléotidique d'Arf6. En revanche la présence du domaine C-terminal à concentration équivalente bloque totalement la liaison d'Arf6 au GTP $\gamma$ S (Figure 46). Cet effet inhibiteur du domaine C-terminal sur la cinétique d'échange nucléotidique d'Arf6 se fait de manière dose dépendante (Figure 47). De manière similaire à l'échange nucléotidique spontané, celui catalysé par EFA6 est également inhibé par la présence du domaine C-terminal. En effet on observe lors de la l'échange nucléotidique catalysé en présence du domaine C-terminal que la vitesse initiale semble peu affectée mais que le plateau est diminué suggérant que le domaine C-terminal piège une fraction d'Arf6-GDP la rendant incapable de lier le GTP (Figure 48). Ces résultats confirment donc l'interaction entre le domaine C-terminal et Arf6-GDP et mettent en évidence que cette dernière est inhibée par la présence du domaine PH.

Par la suite nous avons cherché à déterminer si cet effet du domaine C-terminal était spécifique de l'isoforme Arf6. Pour cela nous avons suivi la liaison spontanée d'Arf1-GDP et d'Arf6-GDP au GTP $\gamma$ S en présence ou non d'une concentration équivalente de domaine C-terminal. Ces expériences montrent qu'à faible concentration de  $MgCl_2$  Arf1 se lie spontanément au GTP $\gamma$ S de manière équivalente à Arf6. En revanche la présence du domaine C-terminal d'EFA6 n'affecte pas l'échange nucléotidique de ce dernier alors qu'il inhibe celui d'Arf6 (Figure 49).

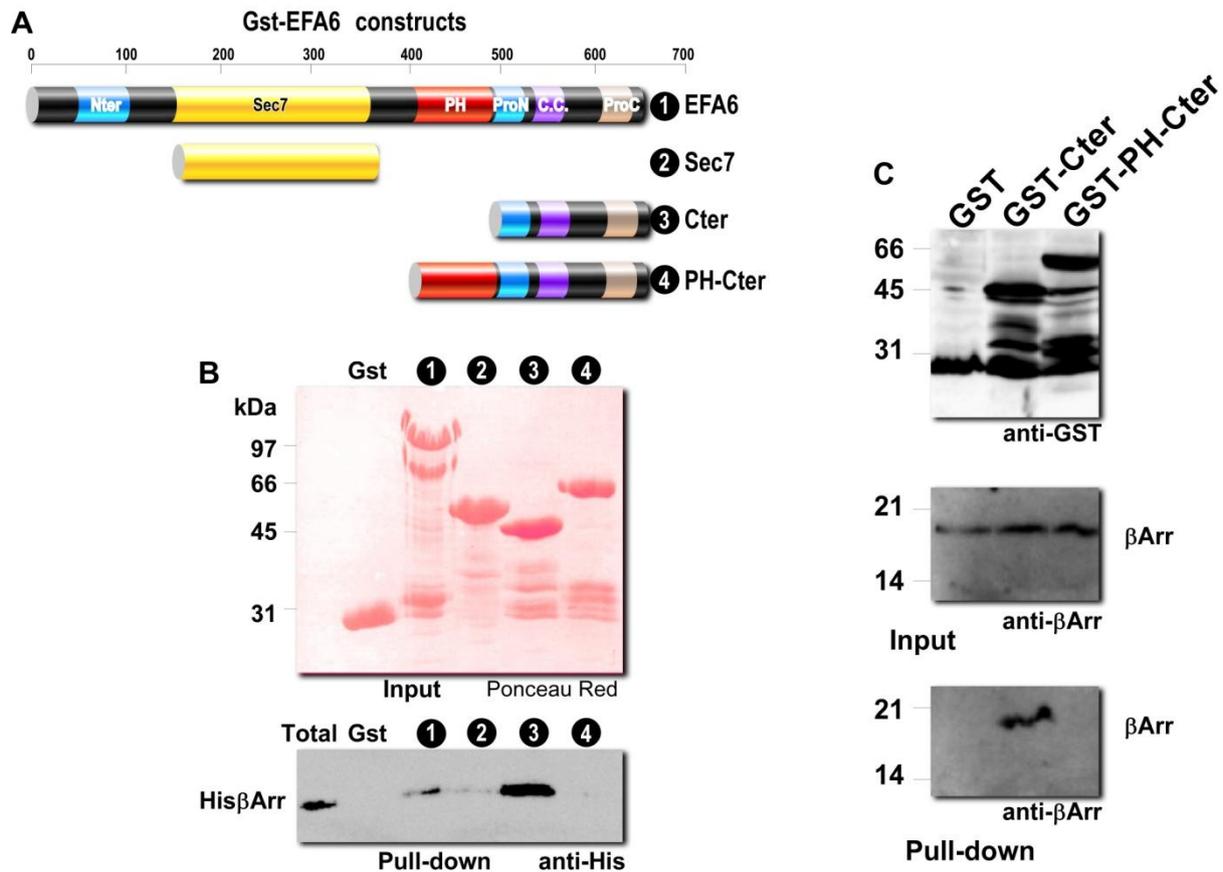
L'ensemble des résultats obtenus a mis en évidence que le domaine C-terminal d'EFA6 interagit spécifiquement avec Arf6-GDP bloquant l'activation de cette dernière.

Nous avons par la suite cherché à identifier le sous domaine du C-terminal impliqué dans l'interaction avec Arf6-GDP. Pour cela nous avons réalisé des expériences de pull down à l'aide des différents sous-domaines du C-terminal seuls ou combinés. Nous avons utilisé les

constructions correspondant au domaine ProN, CC et ProC ainsi que les constructions ProN-CC et CC-ProC. Nous avons pu observer que le domaine C-terminal entier et les constructions ProN et ProN-CC sont capables de précipiter avec elles la protéine Arf6-GDP contrairement à la GST et aux constructions CC, ProC et CC-ProC elles ne précipitent Arf6-GDP (Figure 50). Ces expériences ont mis en évidence que l'ensemble des constructions possédant le domaine ProN sont capables d'interagir avec Arf6-GDP et le domaine ProN seul est suffisant pour permettre cette interaction.

De plus, par des expériences d'immunofluorescence nous avons voulu confirmer cette interaction entre Arf6 et le domaine ProN au niveau de la cellule. Nous avons donc étudié la localisation de ces protéines dans des cellules BHK surexprimant Arf6-HA et une construction du C-terminal correspondant au domaine ProN (Cter V525-GFP). Nous remarquons que le domaine ProN possède une localisation cytosolique. Arf6 se localise principalement au niveau de la membrane plasmique dans des microvillosités. En revanche, on constate quand elles sont co-exprimées, que le domaine ProN se trouve en partie redistribué au niveau de la membrane plasmique dans des structures enrichies en Arf6 (Figure 51).

Ces résultats suggèrent que cette interaction entre Arf6-GDP et le domaine C-terminal d'EFA6 peut également avoir lieu au sein de la cellule.



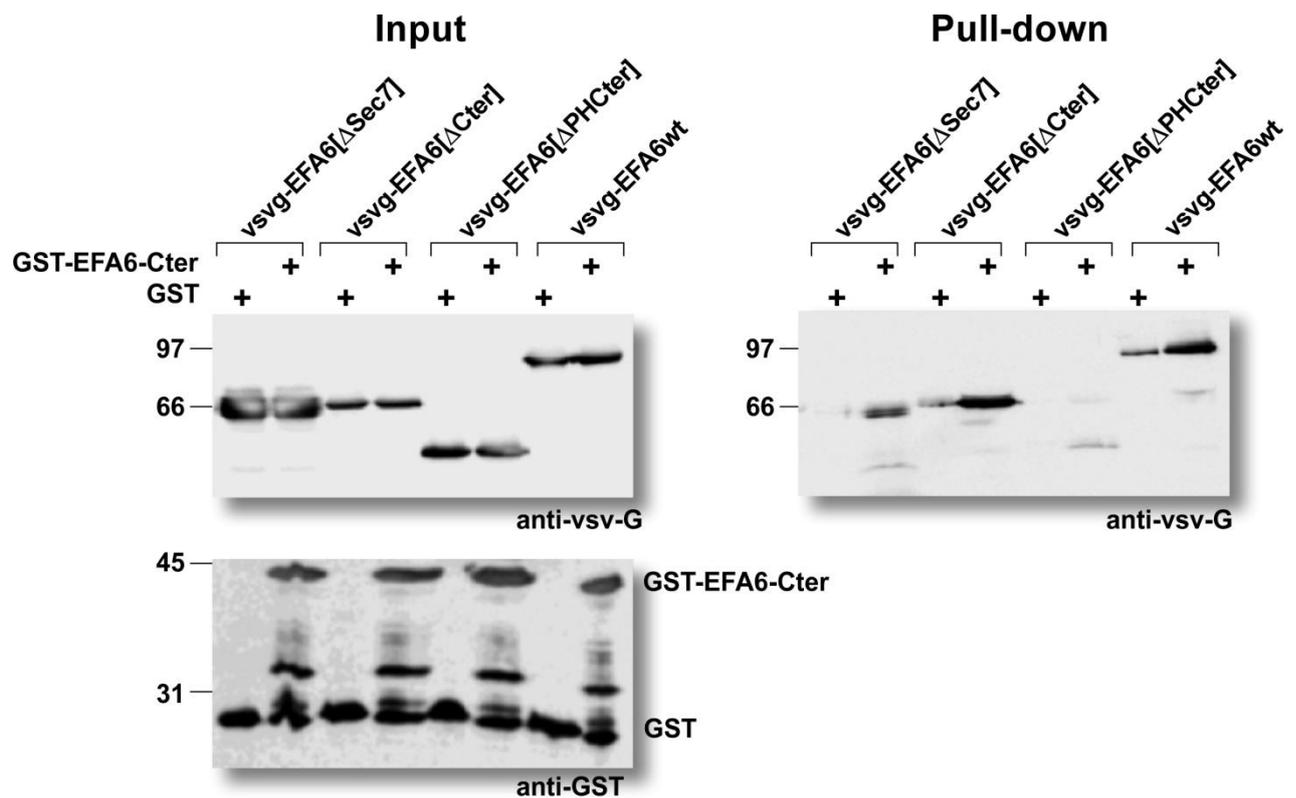
**Figure 39: La présence du domaine PH inhibe l'interaction entre le domaine C-terminal et la  $\beta$ -arrestine.**

A) Schéma représentatif d'EFA6 et des différentes constructions couplées à la GST utilisées dans cette étude.

B) GST pull-down sur protéines purifiées. La protéine His- $\beta$ arrestine est incubée en présence de billes de Glutathion Sepharose avec les différentes constructions d'EFA6 couplées à la GST.

C) Pull-down réalisé sur des cellules BHK transfectées transitoirement avec la  $\beta$ arrestine. Le lysat cellulaire est incubé avec les protéines GST, GST-C-ter et GST PH-C-ter en présence de billes de Glutathion Sépharose.

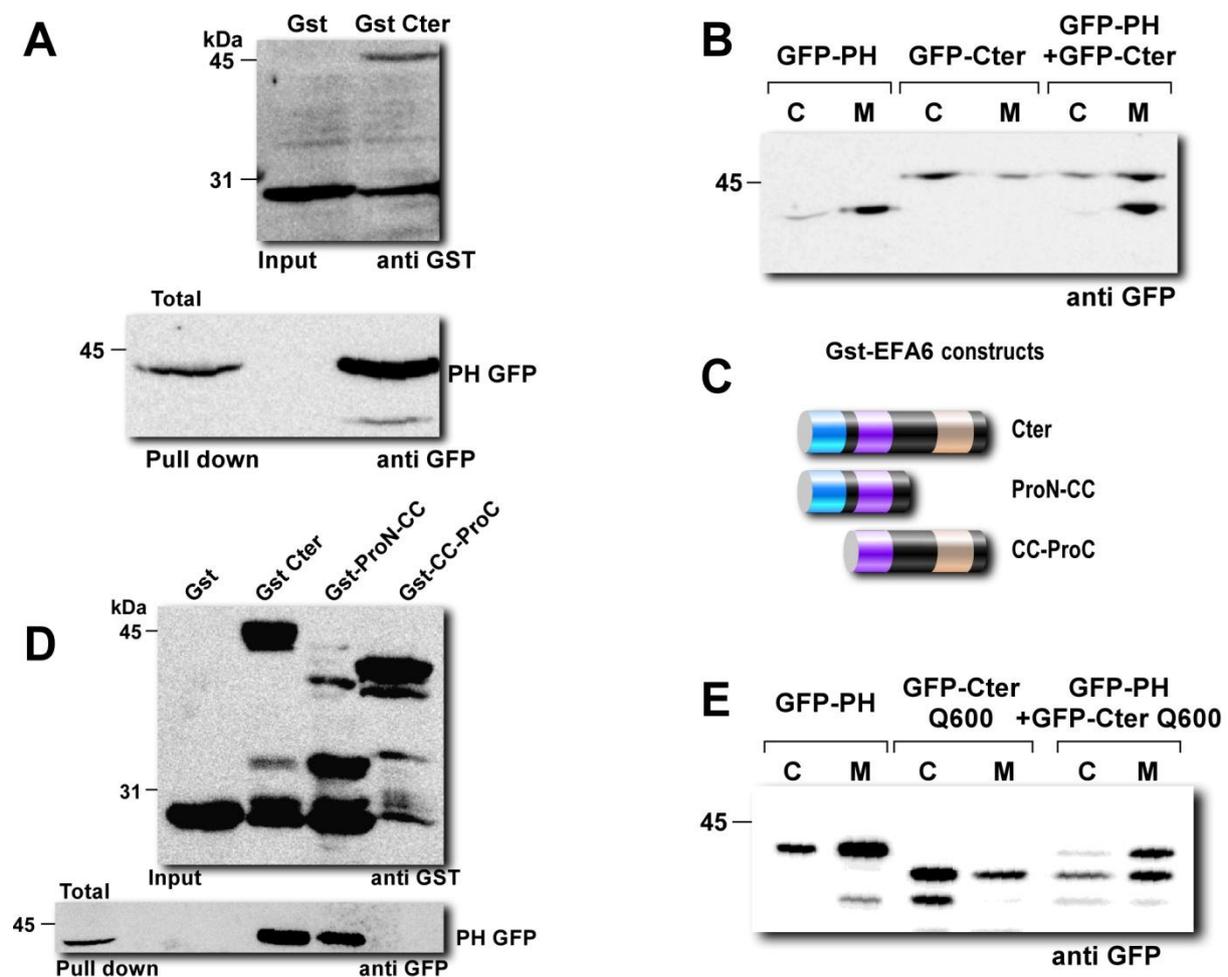
Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par les anticorps correspondants. Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.



**Figure 40: Le domaine C-terminal d'EFA6 interagit avec toutes les constructions possédant le domaine PH d'EFA6**

Pull-down réalisé sur des cellules BHK transfectées transitoirement avec différentes constructions d'EFA6 possédant une étiquette vsv-G. Le lysat cellulaire est incubé avec les protéines GST et GST-C-ter en présence de billes de Glutathion Sépharose.

Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-vsv-G (P5D4). Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.



**Figure 41: Le domaine C-terminal d'EFA6 interagit avec le domaine PH d'EFA6 via sa région ProN-CC**

A) Pull-down réalisé sur des cellules BHK transfectées transitoirement avec le domaine PH d'EFA6 couplé à la GFP. Le lysat cellulaire est incubé avec les protéines GST ou GST-Cter en présence de billes de Glutathion Sépharose.

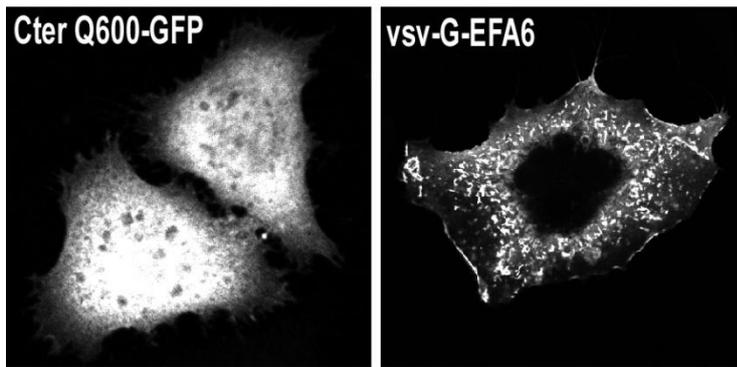
B et E) Fractionnement cytosol-membrane réalisé sur des cellules BHK transfectées avec le domaine PH, le domaine Cter ou Cter Q600 seul ou ensemble couplés à la GFP. Les protéines d'intérêt présentes dans les différentes fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti GFP.

C) Représentation schématique du domaine C-terminal d'EFA6 et des différentes constructions couplées à la GST utilisées dans cette étude.

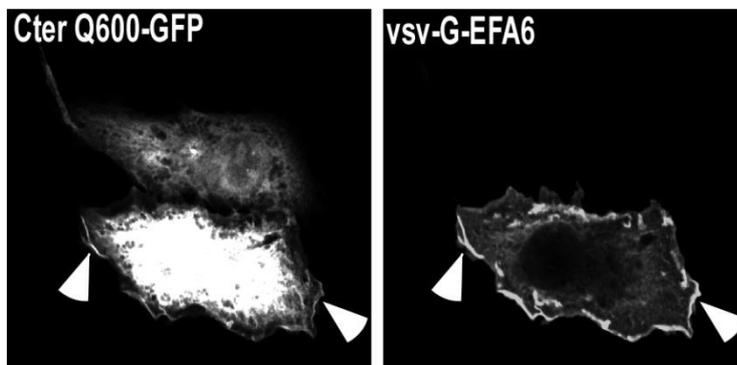
D) Pull-down réalisé sur des cellules BHK transfectées transitoirement avec le domaine PH d'EFA6 couplé à la GFP. Le lysat cellulaire est incubé avec les protéines GST, GST-Cter ou les différentes constructions du domaine C-terminal couplées à la GST en présence de billes de Glutathion Sépharose.

Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-vsv-G (P5D4). Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.

seuls

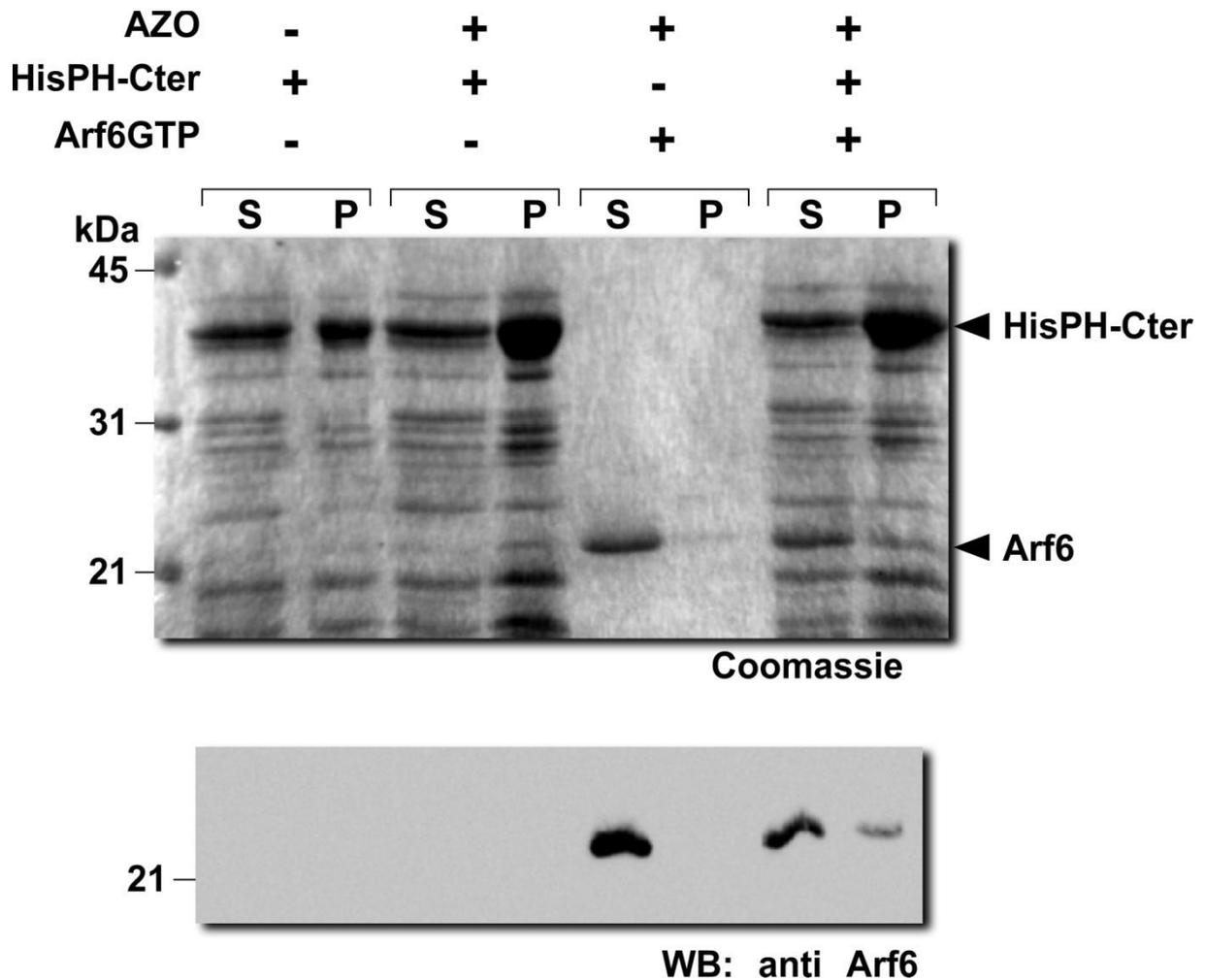


co-exprimés



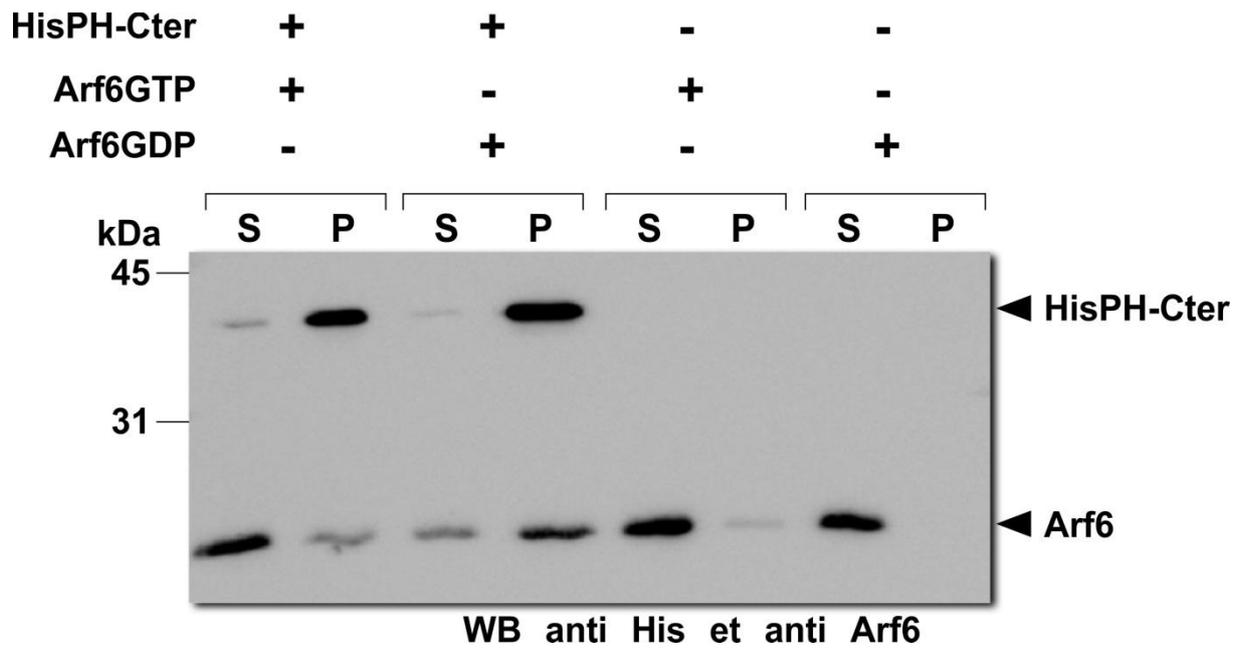
**Figure 42: EFA6 colocalise avec le domaine ProN-CC dans la cellule**

Expérience d'immunofluorescence réalisée sur des cellules BHK transfectées avec le C-ter Q600-GFP (correspondant au domaine ProN-CC) et vsv-G-EFA6 seuls ou ensemble pendant 24H et révéle avec un anticorps anti vsv-G (P5D4). Les flèches indiquent une colocalisation.



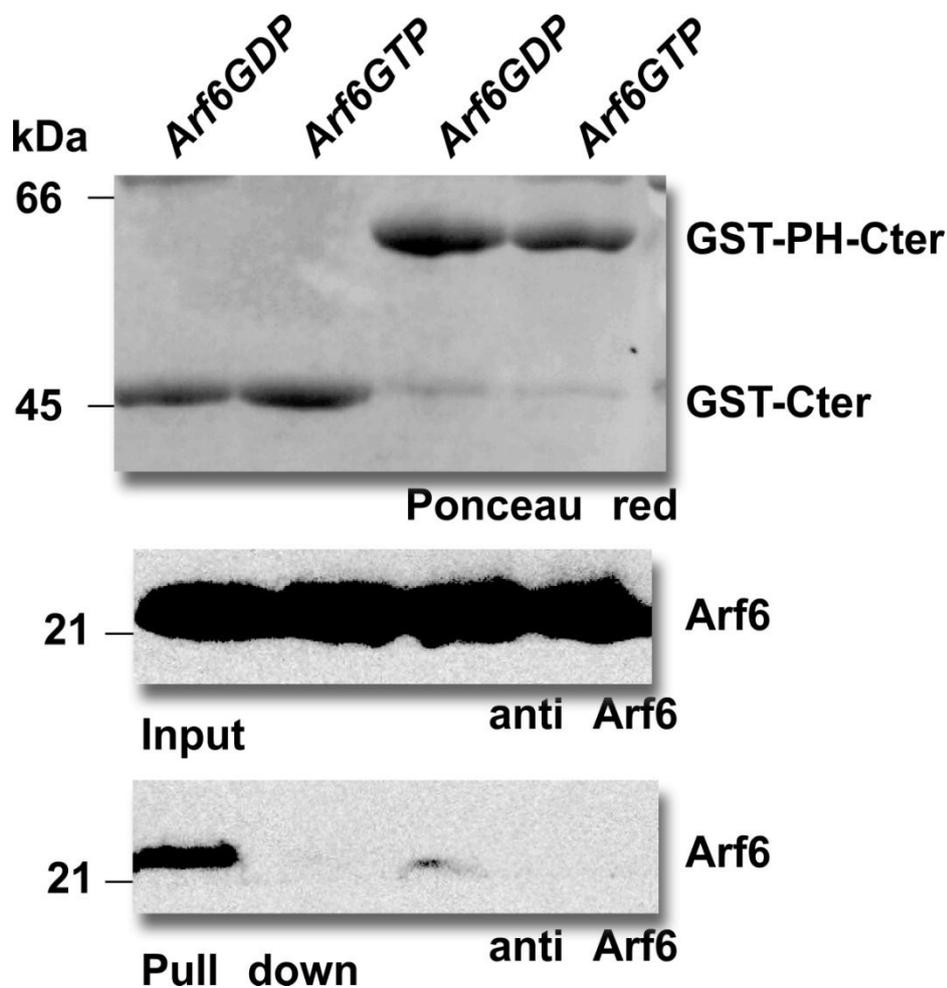
**Figure 43: Le domaine PH-C-terminal d'EFA6 interagit avec Arf6-GTP**

Les protéines His-PH-Cter et Arf6GTP sont incubées seules ou ensemble avec ou sans vésicules lipidiques artificielles (azolectine) puis le mélange est ultra centrifugé. La fraction soluble est collectée et le culot est resuspendu dans un volume équivalent puis collecté. Ces deux fractions sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE. Les protéines d'intérêt sont ensuite révélées par une coloration au bleu de Coomassie ou transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-Arf6.



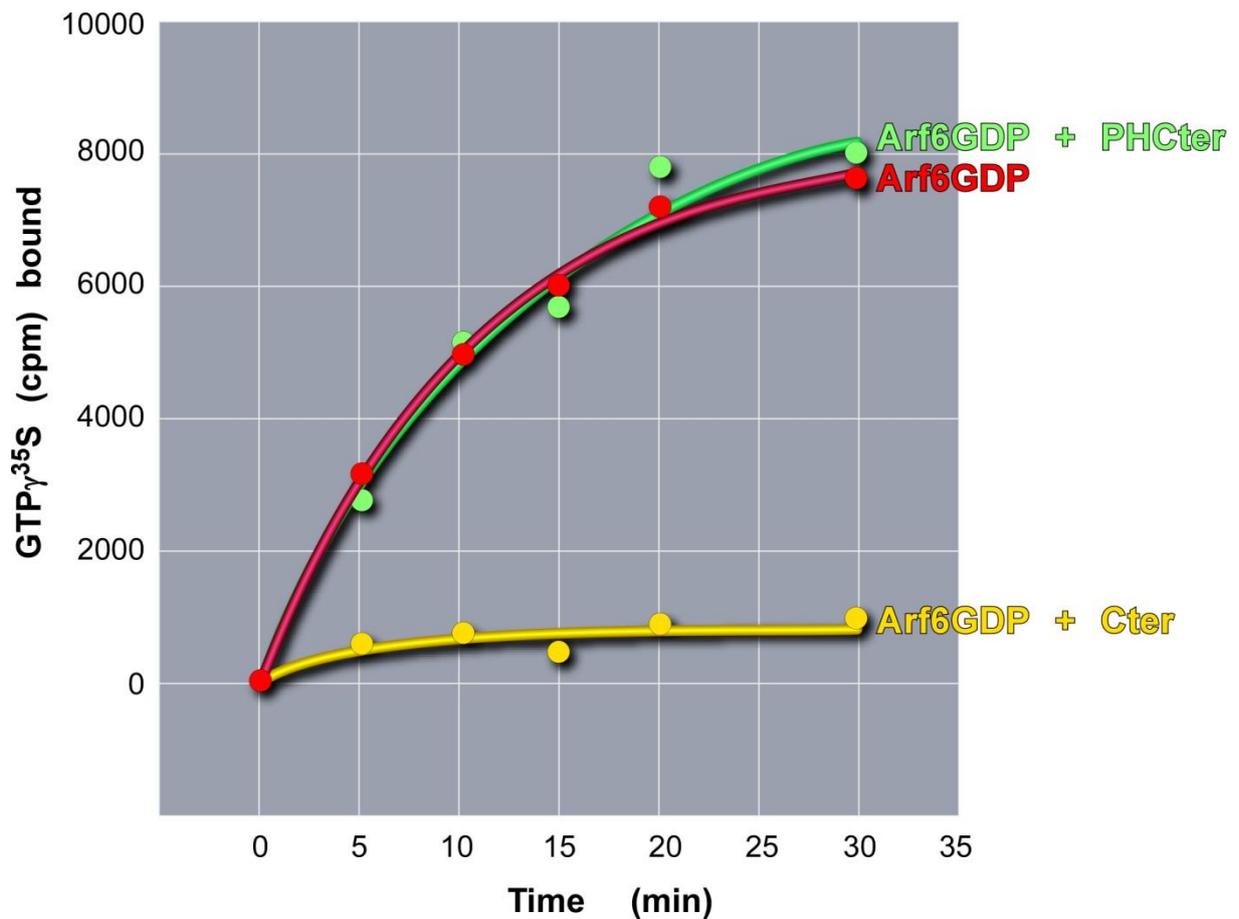
**Figure 44: Le domaine PH-C-terminal d'EFA6 interagit préférentiellement avec Arf6-GDP**

Les protéines His-PH-Cter, Arf6GTP et Arf6-GDP sont incubées seules ou ensemble avec vésicules lipidiques artificielles (azolectine) puis le mélange est ultra centrifugé. La fraction soluble est collectée et le culot est resuspendu dans un volume équivalent puis collecté. Ces deux fractions sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE. Les protéines d'intérêt sont transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par les anticorps correspondants.



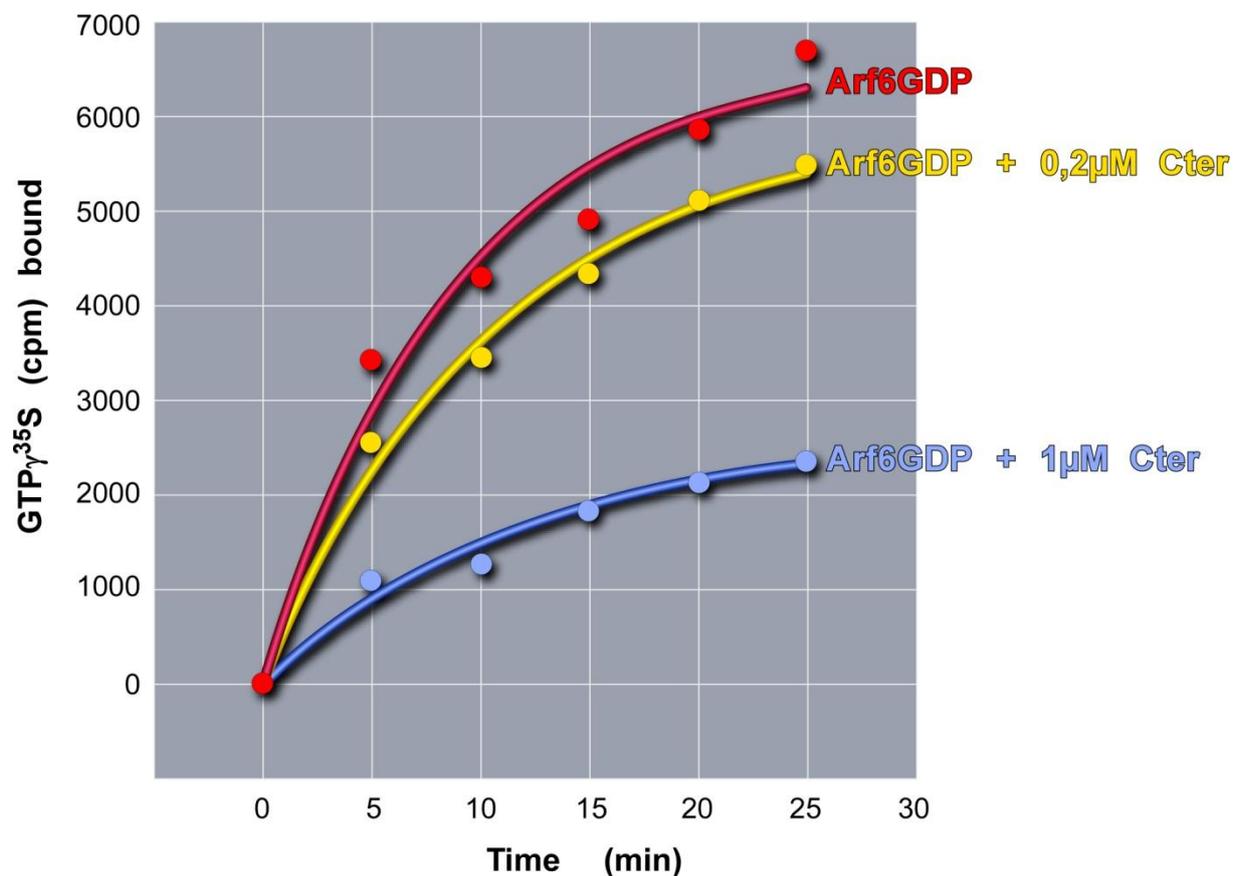
**Figure 45: De manière similaire à la  $\beta$ -arrestine, Arf6-GDP interagit avec le domaine C-terminal mais pas le domaine PH-C-terminal d'EFA6**

GST pull-down sur protéines purifiées. Les protéines Arf6-GDP ou Arf6GTP sont incubées en présence de billes de Glutathion Sepharose avec les protéines GST Cter ou GST PH-Cter. Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-Arf6. Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.



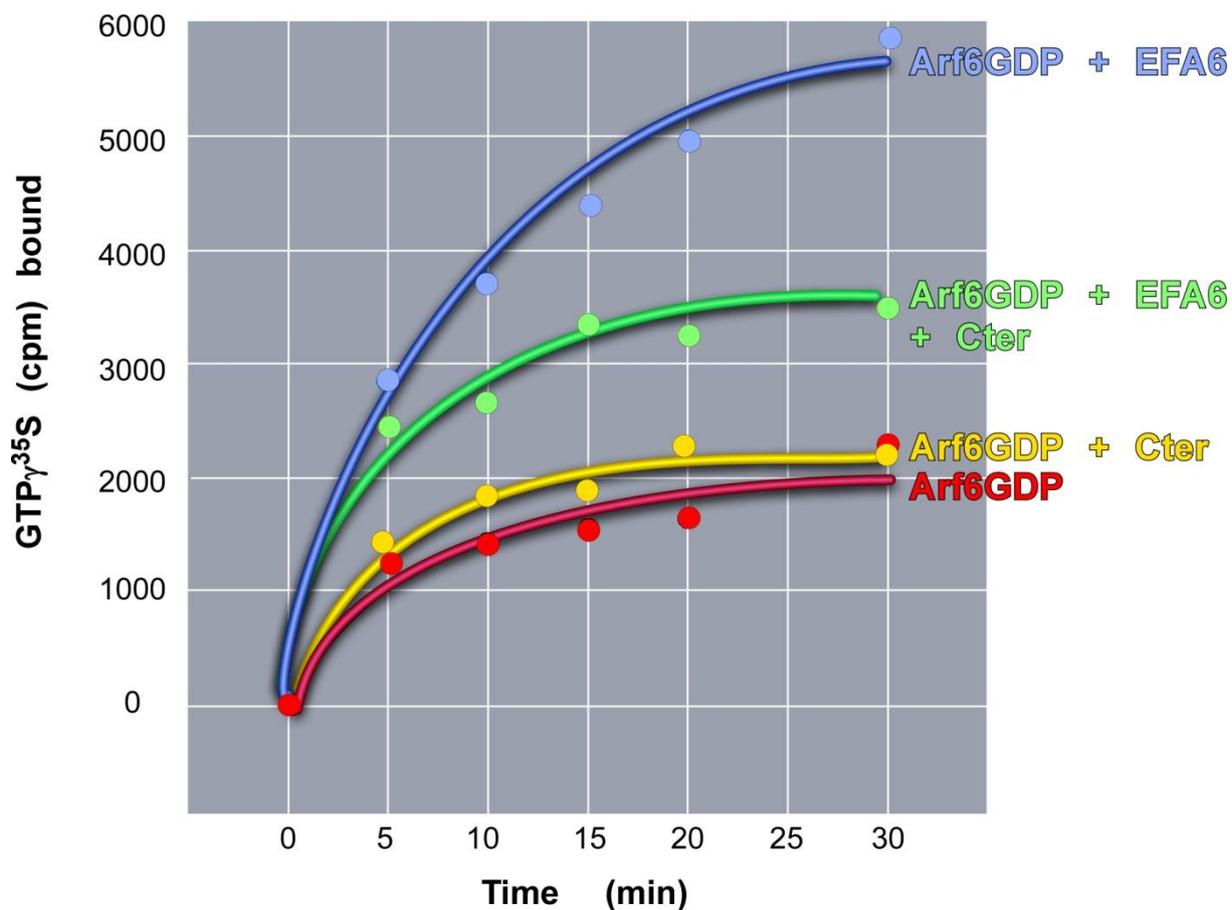
**Figure 46: L'échange spontané GDP/GTP sur Arf6 est inhibée spécifiquement par le domaine C-terminal d'EFA6**

Cinétique de liaison spontanée d'Arf6 non myristylé (1,4 $\mu$ M) au GTP $\gamma$ S[ $^{35}$ S] seul ou en présence des domaines Cter ou PH-Cter (1 $\mu$ M). Les expériences sont réalisées en présence de vésicules lipidiques artificielles (azolectine) et la quantité d'Arf6 liée au GTP $\gamma$ S est déterminée pour chaque temps par filtration sur membrane de nitrocellulose et est exprimée en cpm (coups par minute).



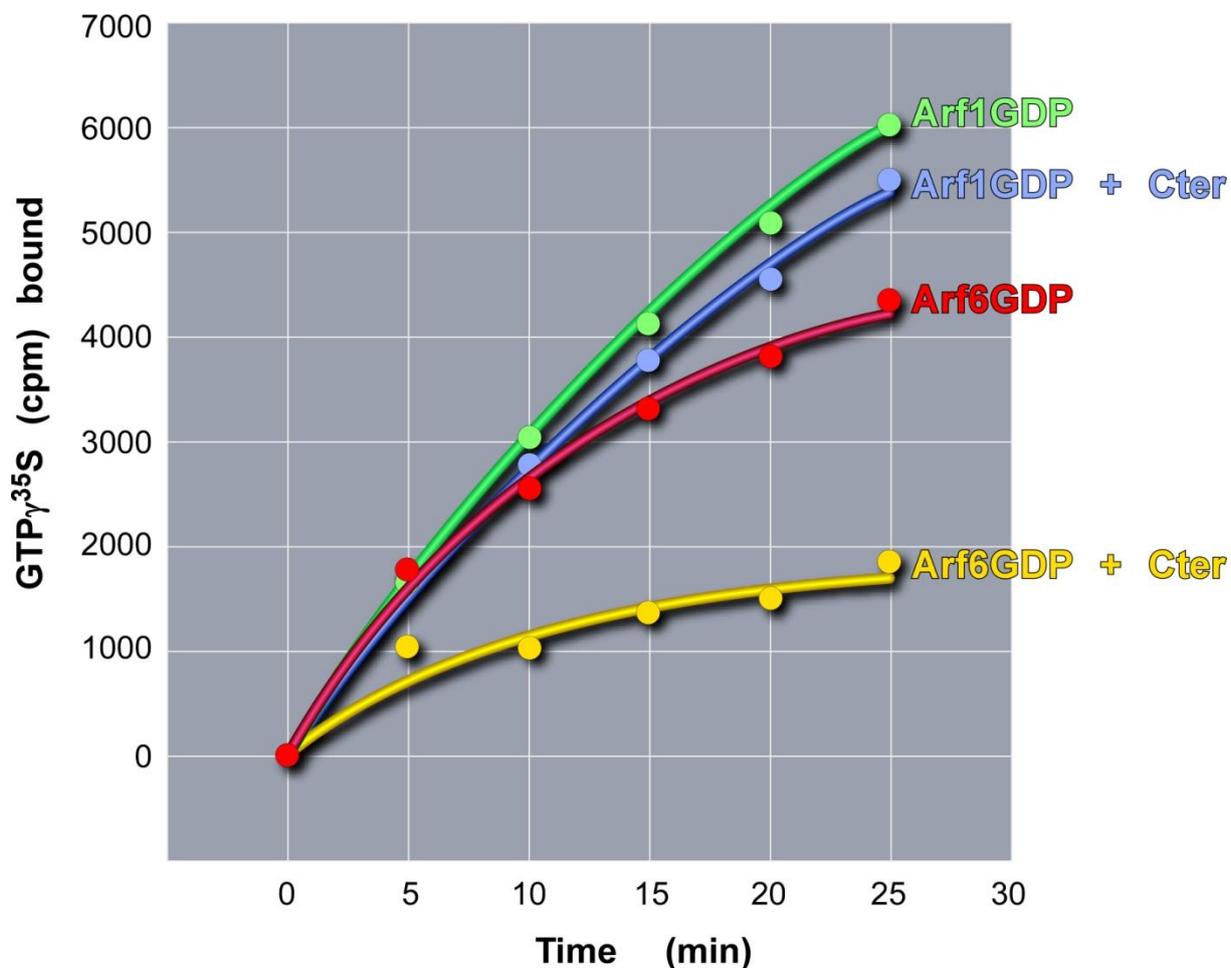
**Figure 47: Le domaine C-terminal d'EFA6 inhibe l'échange nucléotidique spontané d'Arf6-GDP de manière dose dépendante**

Cinétique de liaison spontanée d'Arf6 non myristylé (1,4µM) au GTPγS [<sup>35</sup>S] seul ou en présence de différentes concentration en domaine Cter (0,2 ou 1µM). Les expériences sont réalisées en présence de vésicules lipidiques artificielles (azolectine) et la quantité d'Arf6 liée au GTPγS est déterminée pour chaque temps par filtration sur membrane de nitrocellulose et est exprimée en cpm (coups par minute).



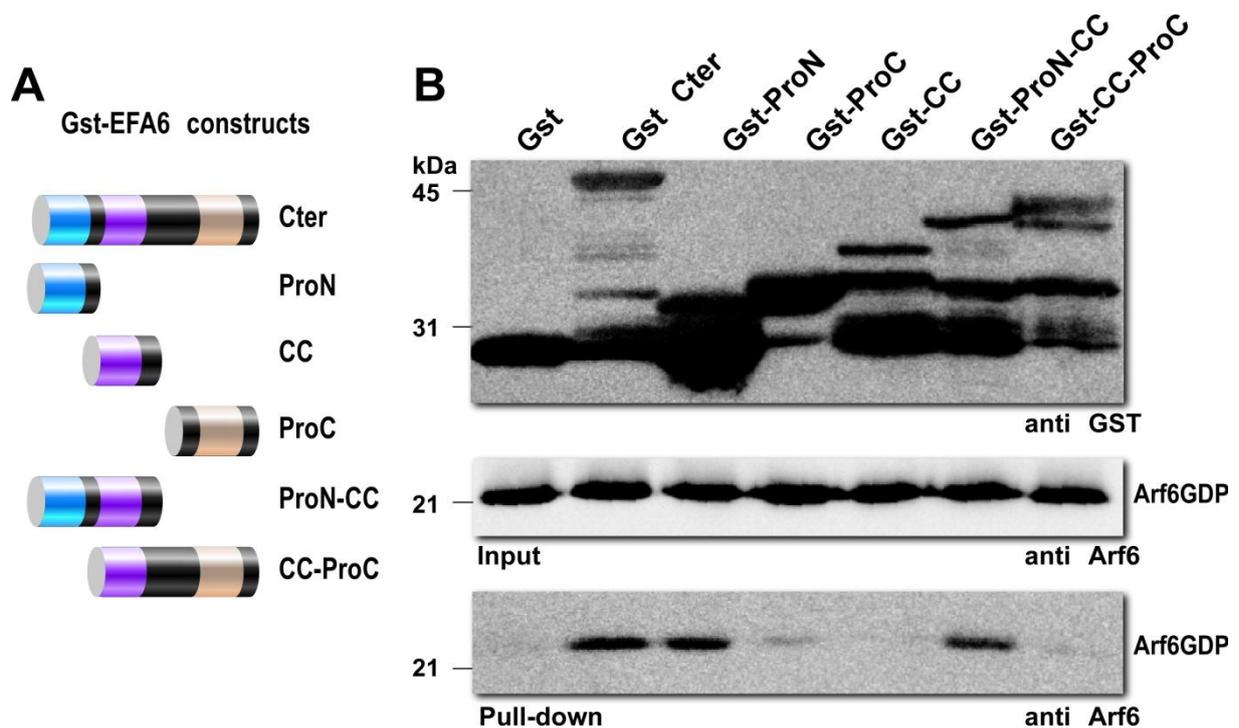
**Figure 48: Le domaine C-terminal d'EFA6 inhibe l'échange nucléotidique d'Arf6-GDP catalysée par EFA6**

Cinétique de liaison spontanée d'Arf6 non myristylé (1,4 $\mu$ M) au GTP $\gamma$ S [ $^{35}$ S] seul ou en présence d'EFA6 (200nM) et du domaine Cter (10 $\mu$ M) seul ou ensemble. Les expériences sont réalisées en présence de vésicules lipidiques artificielles (azolectine) et la quantité d'Arf6 liée au GTP $\gamma$ S est déterminée pour chaque temps par filtration sur membrane de nitrocellulose et est exprimée en cpm (coups par minute).



**Figure 49: Le domaine C-terminal d'EFA6 inhibe spécifiquement l'échange nucléotidique spontané d'Arf6-GDP**

Cinétique de liaison spontanée d'Arf6 et d'Arf1 non myristylé (1,4 $\mu$ M) en GTP $\gamma$ S [ $^{35}$ S] seul ou en présence du domaine Cter (1 $\mu$ M). Les expériences sont réalisées en présence d'azolectine et la quantité d'Arf6 et d'Arf1 liée au GTP $\gamma$ S est déterminée pour chaque temps par filtration sur membrane de nitrocellulose et est exprimée en cpm (coups par minute).



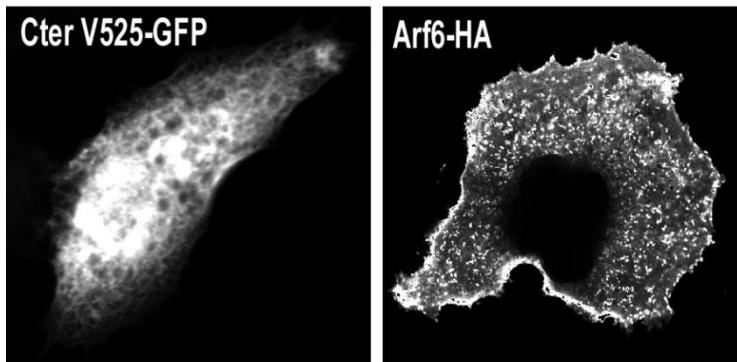
**Figure 50: Le domaine C-terminal d'EFA6 interagit directement avec Arf6-GDP par l'intermédiaire de son extrémité ProN**

A) Schéma représentatif du domaine C-terminal d'EFA6 et des différentes constructions couplées à la GST utilisées dans cette étude.

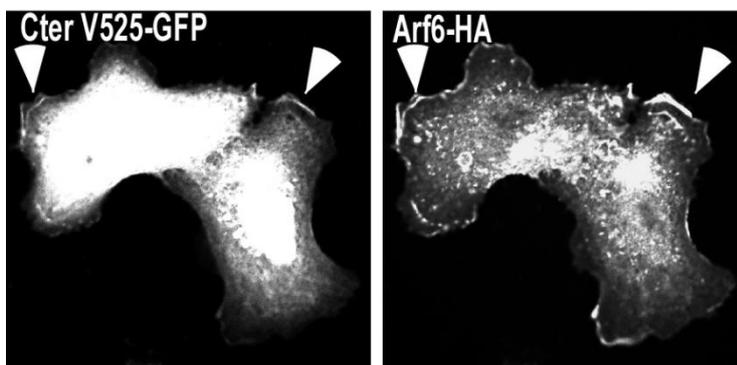
B) GST pull-down sur protéines purifiées. La protéine Arf6-GDP est incubée en présence de billes de Glutathion Sepharose, avec les différentes constructions du domaine C-terminal couplées à la GST.

Les protéines retenues sur les billes sont analysées sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par un anticorps anti-Arf6 (8A6-2). Une fraction du lysat total est analysée pour visualiser la quantité de protéines d'intérêt et de protéines étiquetées GST incubées.

seuls



co-exprimés



**Figure 51: Arf6 et le domaine ProN colocalise dans la cellule au niveau de la membrane plasmique**

Expérience d'immunofluorescence réalisée sur des cellules BHK transfectées avec le Cter V525-GFP (correspondant au domaine ProN) et Arf6-HA seuls ou ensemble pendant 24H et révélées avec un anticorps anti HA. Les flèches indiquent une colocalisation.

## D. Conclusion

EFA6 appartient à la famille des protéines à domaine Sec7 qui sont des facteurs d'échange pour les petites protéines G de la famille Arf. Il existe 4 isoformes de la protéine EFA6 chez l'humain (EFA6A, EFA6B, EFA6C et EFA6D) qui partagent une organisation commune. Ils possèdent un domaine N-terminal dont la fonction reste à déterminer, un domaine Sec7 qui est le domaine catalytique, un domaine PH capable d'interagir avec les phospholipides de la membrane plasmique et un domaine C-terminal qui permet l'interaction avec différents partenaires. EFA6 est impliqué dans différents processus biologiques tels que la réorganisation du cytosquelette d'actine, l'internalisation et le recyclage de différentes protéines membranaires mais également dans la mise en place de la polarité épithéliale. Ainsi une étude précédemment menée au laboratoire a mis en évidence que suite à l'activation par un agoniste du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique, la  $\beta$ -arrestine va pouvoir interagir avec EFA6 et son substrat Arf6-GDP et faciliter l'échange nucléotidique Arf6-GDP/Arf6-GTP catalysé par EFA6. Dans cette étude des mécanismes de régulation de la protéine EFA6 nous avons pu mettre en évidence que l'interaction entre la  $\beta$ -arrestine et EFA6 se faisait par l'intermédiaire du domaine C-terminal d'EFA6. Néanmoins nous avons observé qu'on « perdait » cette interaction lors de nos expériences avec la construction PH-C-terminal. Des résultats préliminaires obtenus en collaboration nous poussent à penser que cet effet inhibiteur du domaine PH sur cette interaction ne serait pas dû à une dimérisation d'EFA6 mais plutôt à un repli intramoléculaire au sein de cette protéine. Nous avons ensuite mis en évidence une interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6. Nous avons pu limiter la zone d'interaction sur le domaine C-terminal et identifier la région riche ProN-CC comme étant impliquée dans l'interaction avec le domaine PH.

EFA6 oscillerait entre au moins deux conformations: une forme où le domaine ProN-CC du C-ter viendrait se replier sur le domaine PH et une forme ouverte où les sites d'interaction pour les partenaires du domaine C-terminal seraient démasqués (Figure 52). Ce mécanisme de régulation par un repli intramoléculaire a déjà été décrit pour ARNO, un autre facteur d'échange pour les Arfs. D'une part des études ont mis en évidence que le domaine Coiled-Coil en Nterminal venait se replier sur le domaine PH empêchant ainsi son interaction avec les membranes. D'autre part il a été décrit que le domaine polybasique en C-terminal venait se replier sur le domaine intermédiaire entre le domaine Sec7 et le domaine PH. Ce repli

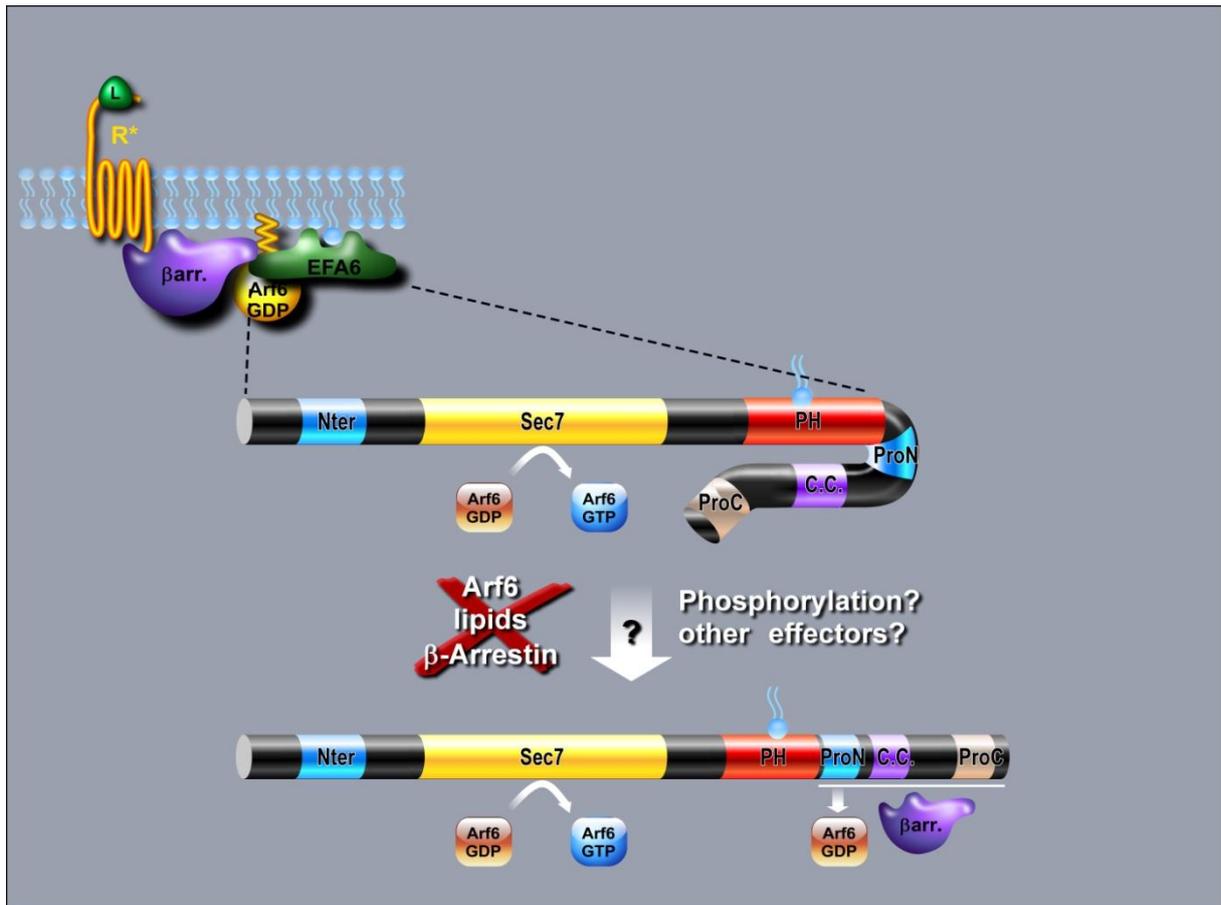
joue le rôle de pseudo-substrat qui bloque ARNO dans une conformation inactive. Parmi les facteurs qui permettent l'ouverture de la protéine ARNO on retrouve la petite protéine G Arf6 sous sa forme GTP. Par analogie nous avons donc cherché à déterminer si Arf6 permettait l'ouverture du facteur d'échange EFA6. Ainsi nous avons pu mettre en évidence une interaction directe entre le domaine C-terminal d'EFA6 et Arf6. Nous avons observé que cette interaction se faisait préférentiellement avec la forme GDP d'Arf6 et avons identifié le domaine ProN du C-terminal comme étant le domaine nécessaire à cette interaction. De manière surprenante nous avons mis en évidence une interaction entre EFA6 et son substrat par un domaine différent que le domaine catalytique. Arf6 ne semble pas être un facteur permettant l'ouverture d'EFA6. En effet bien qu'Arf6-GDP et Arf6-GTP semblent interagir sous certaines conditions avec la construction PH-C-terminale, cette interaction reste relativement faible. Ces observations peuvent être dues à la dynamique de la protéine EFA6. En effet nous pouvons penser que l'interaction entre le domaine PH et le domaine C-terminal d'EFA6 n'est pas statique et que la protéine va osciller entre un état fermé et un état ouvert permettant une probabilité de rencontre entre le domaine C-terminal et Arf6. De plus nous avons pu observer que le domaine PH et Arf6 partageaient partiellement le même site d'interaction sur le domaine C-terminal (respectivement domaine ProN-CC et ProN). Ces résultats laissent imaginer qu'une fois lié, Arf6-GDP pourrait empêcher l'interaction entre les domaines PH et C-terminal et ainsi maintenir EFA6 dans une conformation ouverte.

Nous avons pu également observer une interaction entre la construction PH-C-terminal et Arf6 dans des conditions en présence de vésicules. Néanmoins, les lipides ne semblent pas être un facteur suffisant pour permettre l'ouverture d'EFA6. Bien que les expériences sur la cinétique d'échange nucléotidique d'Arf6 aient été réalisées en présence de liposomes nous n'avons pas observé un effet du PH-C-terminal similaire à celui du domaine C-terminal.

Dans la dernière partie de cette étude nous avons mis en évidence un effet surprenant du domaine C-terminal. Nous avons observé que ce dernier semble avoir un effet inhibiteur sur l'échange nucléotidique d'Arf6 spontané ou catalysé par EFA6. Alors que la vitesse initiale semble être constante, nous remarquons que le domaine C-terminal agit sur le plateau atteint. Le plateau correspond à la quantité maximale d'Arf6 capable de lier le GTP $\gamma$ S. Ces résultats suggèrent que le domaine C-terminal ne ralentit pas la vitesse d'échange mais agit plutôt sur la quantité d'Arf6 capable d'être activée. Nos résultats semblent indiquer que le

domaine C-terminal en interagissant avec Arf6-GDP va piéger cette dernière et empêcher son activation. Néanmoins le rôle de cette interaction entre le domaine C-terminal et Arf6-GDP reste à déterminer.

On peut donc imaginer plusieurs hypothèses. Le domaine C-terminal d'EFA6 pourrait séquestrer un pool d'Arf6-GDP afin de le rendre immédiatement disponible pour être activé par le domaine Sec7 dans des conditions précises et en réponse à divers stimuli. Le domaine C-terminal d'EFA6 pourrait également être à l'origine d'une deuxième voie de signalisation dépendante d'Arf6-GDP et indépendante de l'activité catalytique du domaine Sec7. Cet Arf6-GDP piégé par le domaine C-terminal pourrait interagir avec ses propres effecteurs et les recruter dans des conditions précises afin de contrôler d'autres voies de signalisation. Nous retrouvons notamment parmi les effecteurs d'Arf6-GDP FE65, une protéine adaptatrice enrichie dans le cerveau et interagissant avec la protéine APP (Amyloid Precursor Protein). Il a été montré que cette interaction est impliquée dans la croissance des neurites



**Figure 52: Modèle du mécanisme de régulation du facteur d'échange EFA6**

Le facteur d'échange EFA6 oscille entre un état où le domaine C-terminal est replié sur le domaine PH et un état ouvert permettant son interaction avec différents partenaires.