HAL
open science

# Interaction entre membrane plasmique et cytosquelette : Approche biomimétique pour l'étude des interactions entre ezrine, PIP2 et actine

Kevin Carvalho

## To cite this version:

Kevin Carvalho. Interaction entre membrane plasmique et cytosquelette : Approche biomimétique pour l'étude des interactions entre ezrine, PIP2 et actine. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2009. Français. NNT : . tel-00514808

**HAL Id: tel-00514808**

**https://theses.hal.science/tel-00514808v1**

Submitted on 3 Sep 2010

**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.

***UNIVERSITE MONTPELLIER II***
***SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC***

***T H E S E***

*pour obtenir le grade de*

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II**

***Discipline : Physique***

***Ecole Doctorale : « Information, Structure et Systèmes »***

*présentée et soutenue publiquement*

*par*

*CARVALHO Kévin*

*Le 20 novembre 2009*

# *Interaction entre membrane plasmique et cytosquelette : Approche biomimétique pour l'étude des interactions entre ezrine, PIP2 et actine*

**JURY**

| | |
|---|---|
| *M.* | *, Président* |
| *Bruno Antonny* | *, Rapporteur* |
| *Laurent Blanchoin* | *, Examinateur* |
| *Vladimir Lorman* | *, Examinateur* |
| *Catherine Picart* | *, Directeur de Thèse* |
| *Laurence Ramos* | *, Directeur de Thèse* |
| *Catherine Royer* | *, Examinateur* |
| *Cécile Sykes* | *, Rapporteur* |

# Remerciements :

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire des colloïdes verres et nanomatériaux et dans le laboratoire de dynamique des interactions membranaires normales et pathologiques sous la direction de Laurence Ramos et Catherine Picart.

Je voudrais tout d'abord remercier Laurence Ramos et Catherine Picart pour m'avoir accueilli et avoir dirigé mon travail pendant ces trois ans de thèse. Elles m'ont toute les deux aidé dans mes démarches d'apprenti expérimentateur et m'ont soutenu et elles m'ont toujours poussé à donner le meilleur de moi-même.

Je souhaite remercier particulièrement le docteur Christian Roy. Mon incursion dans la biologie n'aurait pas pu se faire sans les innombrables « questions idiotes » que je lui ai posées, et sa patience et sa pédagogie font de lui un instructeur hors pair. Sa bonne humeur a toujours mis un peu de gaité au labo même lors des mauvais jours.

Je tiens vivement à remercier les personnes ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse pour leur intérêt et leur regard critique qu'ils ont porté sur mon travail. Je remercie particulièrement Cécile Sykes et Bruno Antonny d'avoir acceptés la lourde tâche d'être rapporteurs. Je remercie Laurent Blanchoin pour sa présence dans mon jury et pour l'enthousiasme dont il a toujours fait preuve. Merci également à Catherine Royer qui m'a accueilli dans l'enceinte de son laboratoire pour certaines expériences. Enfin, merci à Vladimir Lorman mon ancien professeur de Master 2, qui a toujours rendu ses cours vivants et plein d'entrain, et qui fait beaucoup pour le développement de la biophysique à Montpellier.

Pendant ma thèse j'ai pu bénéficier des conseils et du soutien, à la fois scientifique et amical de nombreuses personnes. Je remercie Andrea Parmeggiani pour son intérêt, sa bonne humeur et sa capacité à réussir à vous faire parler en toutes circonstances. Je remercie particulièrement « mes co-équipiers », Sylvain Monnier, Thomas Crouzier et Claire Nicolas qui ont supporté mes divagations ainsi que mes plaisanteries douteuses mais qui se sont toujours montrés réconfortants lorsque je n'étais pas sûr de moi-même. Je remercie aussi Mickael Saen, sans qui, je serai resté le seul fan de voitures de sports au laboratoire !

Je tiens à remercier tous ceux qui par leur présence au laboratoire ou leur amitié m'ont soutenu et accompagné pendant ces trois ans : Antoine Grimaldi, Guillaume Fargier, Nelly, Anne, Fabrice, Thomas.

Merci à ma famille, mes parents et mes deux sœurs, Jess et Sab, de m'avoir soutenue et de toujours croire en moi. Merci à toi Valie, ta gentillesse et tes encouragements ainsi que ton amour ont guidé ma vie depuis que je te connais, rien n'aurait été possible sans toi à mes cotés : me supporter n'est pas facile et pourtant c'est le miracle que tu accomplies chaque semaine, merci 1000 fois.

Enfin, je souhaite avoir une pensée pour mes amis qui me soutiennent depuis le lycée : Julien et Nath, Sylou et Ade, Audrey et Julien, Nico et Aurélien, Cécile et Mathieu.

# Table des matières

**Avant propos**……9

## I – Introduction

**I.A – Quelques notions sur la cellule**……11

I.A.1 – Les membranes biologiques…….11
I.A.1.a – Définition et description microscopique
I.A.1.b – Composition des membranes
I.A.1.c – Dynamique moléculaire au sein de la membrane plasmique

I.A.2 – Les phosphoinositides : médiateurs et acteurs clés de la signalisation cellulaire……....19
I.A.2.a – Présentation des phosphoinositides les plus courants
I.A.2.b – Aperçu de la localisation et des différents rôles des phosphoinositides
I.A.2.c – Un lipide régulateur clé : le phosphatidylinositol biphosphate (PIP2)

I.A.3 – Les protéines ERM (Ezrine, Radixine, Moesine)…….26
I.A.3.a – Description et structure des ERM
I.A.3.b – la régulation des ERM
1. La phosphorylation
2. La liaison au PIP2
I.A.3.c – Les fonctions des ERM
1. Localisation des ERM
2. Fonction biologique des ERM : expériences *in cellulo*
3. Rôle physiologique des ERM : expériences *in vivo*
4. Oligomérisation de l'ezrine observée *in cellulo*

I.A.4 – Le cytosquelette et les filaments d'actine…….35
I.A.4.a – Définition et description du cytosquelette
I.A.4.b – Les filaments d'actine
I.A.4.c – Les protéines régulatrice de la dynamique de l'actine
I.A.4.d – Interaction entre ezrine et actine
1. Aspects structuraux
2. Expériences in vitro et in cellulo

**I.B – In vitro : les membranes biomimétiques** ……45

I.B.1 – Description des différents types de systèmes biomimétiques……...45

I.B.2 – Organisation du PIP2 dans les membranes modèles et sensibilité aux ions…..48
I.B.2.a – Formation de domaine de PIP2 dans les membranes modèles ?
I.B.2.b – Interaction du PIP2 avec les ions divalents

I.B.3 – Etude des interactions entre proteines et PIP2 à l'aide de MLV et LUV……..49

I.B.4 – Etude menées sur les GUV et les SLB……..51
I.B.4.a – Exemple d'études menées sur les GUV ne contenant pas de PIP2
I.B.4.b – Etudes menées sur des GUV contenant du PIP2
I.B.4.c – Etudes menées sur des membranes planes contenant du PIP2

**I.C – Positionnement du sujet** ……..55

# II – Matériels et méthodes

**II.A – Lexique des solutions et produits utilisés** …….58

II.A.1 – Produits……58

II.A.2 – Solutions……..59

**II.B – Production et purification des protéines** ……...60

II.B.1 – Purification de l'actine……..……...60

II.B.2 – Principe de la production et de la purification de l'ezrine……...61
II.B.2.a – Insertion du plasmide dans les bactéries
II.B.2.b – Induction de la production de l'ezrine et récupération
II.B.2.c – Purification de l'ezrine sur une colonne FPLC

II.B.3 – Protéines produites……...65

II.B.4 – Conservation et stabilité……...67

**II.C – Objets biomimétiques**……..68

II.C.1 – Lipides et conditions de stockage……68

II.C.2 – production de vésicules géantes par électroformation…….71
II.C.2.a – La surface conductrice : les lames ITO
II.C.2.b – Dépôt des lipides sur les lames ITO et séchage
II.C.2.c – Montage de la chambre d'électroformation
II.C.2.d – Obtention de vésicules géantes unilamellaires (GUV)

II.C.3 – Formation de vésicules multilamellaires et petites vésicules……..76
II.C.3.a – Formation de vésicules multilamellaires (MLV)
II.C.3.b – Extrusion des MLV

**II.D – Méthodes d'observation**……..79

II.D.1 – Microscopie a contraste de phase……79

II.D.2 – Microscopie de fluorescence……...80

II.D.3 – Microscopie confocale……83

II.D.4 – Préparation des vésicules pour une observation au microscope…….85

II.D.5 – Microscopie à onde évanescente (TIRF)……86
II.D.5.a – Principe du montage
II.D.5.b – Préparation des échantillons pour une observation TIRF

II.D.6 – Analyse d'images……89
II.D.6.a – Visualisation du marquage de la membrane dans une solution fluorescente
II.D.6.b – Quantification de l'hétérogénéité de la membrane des GUV
II.D.6.c – Analyse des images issues du TIRF
1. Mesure des vitesses d'élongation et de la constante d'association
2. Mesure de la densité de filaments

**II.E – Techniques de biochimie**…….94

II.E.1 – Gels d'électrophorèse SDS-Page…….94

II.E.2 – Marquage des GUV avec des anticorps fluorescents……...95

II.E.3 – Western Blot…….96

**II.F – Techniques physiques**……..97

II.F.1 – Diffusion de lumière…….97
II.F.1.a – Principes et rappels théoriques
II.F.1.b – Diffusion statique
II.F.1.c – Diffusion dynamique
II.F.1.d – Montage expérimental, analyse et préparation des échantillons

II.F.2 – Expériences de fluorescence du tryptophane…….101
II.F.2.a – Principe
II.F.2.b – Montage expérimental et préparation des échantillons

II.F.3 – Mesure du potentiel zêta des vésicules……..102
II.F.3.a – Définition et principe de mesure
II.F.3.b – Montage expérimental
II.F.3.c – Préparation des échantillons et mesures

II.F.4 – Calorimétrie de titration isotherme (ITC)……..106
II.F.4.a – Principe de la mesure
II.F.4.b – Montage expérimental, préparation des échantillons et traitement des données

# III – Résultats et discussion

**III.A – Interaction entre ezrine et PIP2**……...111

III.A.1 – Activation et changement conformationnel de l'ezrine……111
III.A.1.a – Fluorescence intrinsèque du tryptophane

III.A.1.b – Calorimétrie isotherme à titration
III.A.1.c – Sensibilité à la chymotrypsine
III.A.1.d – Discussion : le changement conformationnel

III.A.2 – Formation de multimères d'ezrine en présence de PIP2……...121
III.A.2.a – Expériences de Western Blot
III.A.2.b – Expériences de diffusion de lumière
III.A.2.c – Discussion : formation des multimères et irréversibilité de l'interaction

III.A.3 – Bilan……..139

**III.B – Vésicules géantes incorporant du PIP2 : caractérisation et interaction avec l'ezrine**……..……..140

III.B.1 – Caractérisation de l'insertion du PIP2 dans les GUV……....….140
III.B.1.a – visualisation en immunofluorescence
III.B.1.b – Visualisation en fluorescence
III.B.1.c – Comparaison des deux méthodes
III.B.1.d – Influence de la longueur des chaines et du type de fluorophore des analogues fluorescents du PIP2
III.B.1.e – Potentiel zêta sur les GUV : validité de la technique
III.B.1.f – Potentiel zêta des GUV

III.B.2. – Comportement des GUV dans un milieu salin……156
III.B.2.a – Stabilité des GUV dans un milieu salin sans ions divalents
III.B.2.b – Stabilité des GUV dans un milieu contenant des ions divalents

III.B.3 – Visualisation des interactions entre ezrine et GUV……..161
III.B.3.a – Choix des conditions expérimentales
III.B.3.b – Quantification des interactions entre ezrine et GUV
III.B.3.c – Discussion : toutes les GUV ne sont pas marquées par l'ezrine
III.B.3.d – Formation d'agrégats d'ezrine et réorganisation du PIP2 dans la membrane des GUV
III.B.3.e – Irréversibilité de la liaison ezrine / GUV

III.B.4 – Conclusion……177

**III.C – Interactions entre ezrine, actine et PIP2**…….178

III.C.1 – Suivi de la polymérisation par spectrofluorimetrie……...178

III.C.2 – Expériences de microscopie à onde évanescente……..181
III.C.2.a – Polymérisation d'actine dans différentes conditions
III.C.2.b – Polymérisation en présence de profiline et d'ezrine fluorescente
III.C.2.c – Polymérisation d'actine en présence de billes recouvertes d'ezrine

III.C.3 – Discussion……..……194

III.C.4 – Conclusion……..……198

## IV – Discussion générale et conclusion

IV.1 – Discussion générale……...……...…….…..200

IV.2 – Conclusion…….……...……...205

Annexe …….....……..……206

Articles.……..……..……211

Bibliographie.……..……..……237

# Avant propos

La biologie moderne montre que les êtres vivants, des plus petits au plus grands, sont d'une incroyable complexité. Aujourd'hui, les scientifiques commencent à comprendre comment les proteines interagissent entre elles, comment les cellules interagissent entre elles. Néanmoins il reste un pas de géant à faire avant de comprendre comment, au sein d'un organisme composé de milliard de cellules, des fonctions biologiques émergent. Les mécanismes fondamentaux qui dictent les interactions entres les différents constituants d'un organisme (cellules, macromolécules, tissus) sont pour la plupart encore inconnus.

Les systèmes biologiques intéressent de plus en plus les physiciens, qui voient dans cet inconnu un nouveau défi : quelques soient les mécanismes à l'origine de l'organisation de la vie, ceux-ci ne peuvent être que des mécanismes physiques (mécanique, électrostatique, etc…). Aussi, depuis une trentaine d'années une discipline métissée fait son apparition, la biophysique qui s'appuie sur des concepts (par exemple les forces, énergies, symétries), des approches expérimentales (mimer certaines fonctions cellulaires par exemples) et des instrumentations physiques (développement de la microscopie par exemple) pour comprendre les interactions élémentaires qui ont lieu au sein des cellules.

Ma thèse se situe à l'interface entre la physique et la biologie : nous avons couplé une approche biomimétique à des techniques de microscopie, de biochimie, de diffusion de lumière et de spectrofluorimetrie afin d'explorer les interactions entre le squelette de la cellule (cytosquelette) et la membrane externe de celle-ci (membrane plasmique).

Ce travail faisant appel à plusieurs domaines, la première partie a pour objectif de donner des définitions et d'apporter les bases utiles à la compréhension du système biologique étudié : cela consiste en une revue de la littérature concernant les membranes lipidiques, les phosphoinositides et les protéines ERM, le cytosquelette ainsi que les différents systèmes biomimétiques utilisés dans la littérature. La seconde partie exposera les différentes techniques que j'ai été amené à utiliser durant mon travail de recherche. La troisième partie présentera les résultats que j'ai obtenus et en quoi ils sont utiles pour comprendre les interactions et les phénomènes entre les différents constituants de mon système. Enfin le manuscrit se termine par une discussion générale ainsi que par les perspectives de mon travail.

# I – Introduction

La compréhension des interactions intracellulaires entre membrane plasmique et cytosquelette nécessitent quelques définitions fondamentales.
Dans le souci de positionner le sujet de ma thèse dans le contexte scientifique actuel, j'introduirai les objets biologiques que sont les membranes biologiques, ses différents constituants, la protéine que nous avons étudiée (l'ezrine) et le cytosquelette d'actine. Ensuite je donnerai une vision générale des différentes études utilisant des systèmes biomimétiques. Enfin je poserai les questions qui ont motivées mon étude.

# I.A – Quelques notions sur la cellule

## II.A.1 – Les membranes biologiques

Les cellules sont définies comme étant les unités fonctionnelles fondamentales des systèmes vivants. L'intégrité de la cellule est préservée grâce à la présence d'une enveloppe externe appelée membrane plasmique. L'existence de cette membrane représente un des fondements majeurs de l'organisation de la vie car elle permet d'isoler le contenu cellulaire du monde extérieur tout en autorisant les échanges contrôlés. En effet, le contenu des cellules est cloisonné en un grand nombre de compartiments fonctionnels formant les organites intracellulaires qui sont bordés par une, voire deux membranes (comme l'enveloppe nucléaire) (*fig I.A.1*). Enfin, certains organites spécialisés dans la conversion d'énergie (mitochondries, chloroplastes) renferment un très grand nombre de membranes internes ou présentent des repliements très complexes de l'une des membranes qui les enveloppent (**Alberts et al. 2008**).

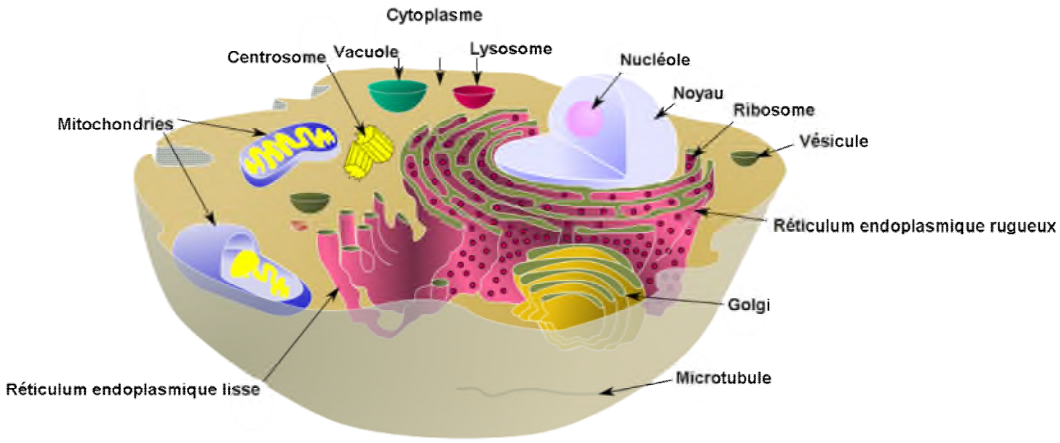



Fig I.A.1. Représentation schématique d'une cellule. Les différents organites cellulaires et la cellule elle-même sont délimités par une membrane. Adapté de Wikipédia.

### ***III.A.1.a – Définition et description microscopique***

Chez tous les êtres vivants, les membranes sont formées de lipides auto-assemblés en bicouches, c'est-à-dire un double feuillet d'épaisseur 5 nm environ. Les lipides qui composent les membranes sont des molécules amphiphiles. Elles possèdent une tête polaire hydrophile et deux chaînes d'acides gras hydrophobes saturées ou insaturées (*fig I.A.2*) (**Leterrier 1997**).

Dans l'eau, principal composant des cellules et du milieu extracellulaire, les lipides s'orientent spontanément pour former une double couche, dans laquelle les queues hydrophobes se font face en raison de leur affinité réciproque, et les têtes polaires sont dirigées vers l'eau (*fig I.A.2*). L'organisation ainsi créée minimise l'énergie du système (énergie libre de Gibbs), critère physique important pour la stabilité de l'édifice. Les forces en jeu permettant de la maintenir sont de faible énergie, essentiellement de type van der Waals ou hydrophobes (**Israelachvili 1991**).

Mais le rôle des membranes ne se limite pas à celui de cloisonnement. Elles interviennent aussi dans une variété de processus biologiques indispensables à la vie comme par exemple les phénomènes de transport, la transduction de signaux ou les processus de conversion d'énergie (**Alberts et al. 2008**).

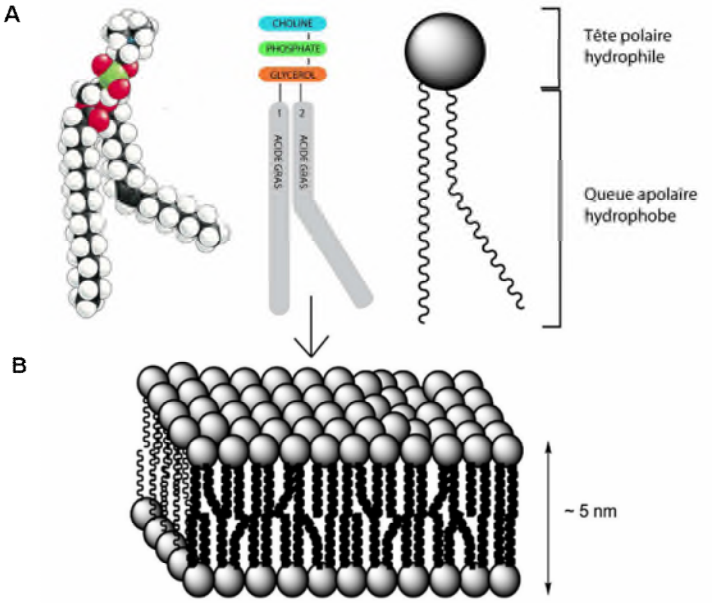



Fig I.A.2. (A) Schéma d'un phospholipide. La tête polaire est la partie hydrophile et les chaînes carbonées constituent la partie hydrophobe. (B) Les phospholipides s'associent pour former des bicouches lipidiques. Adapté de Alberts et collaborateurs (**Alberts et al. 2008**).

### ***III.A.1.b – Composition des membranes***

Les membranes cellulaires sont constituées principalement de deux classes de composés : des lipides et des protéines.

Les lipides membranaires représentent 30 à 50 % de la masse membranaire selon le type d'organite. Il existe trois types de lipides membranaires (*fig I.A.3*) :

- Les glycérophospholipides, ils sont composés d'un squelette de base glycérol, sur lequel deux des fonctions alcool sont estérifiées par des acides gras, constituant les chaînes hydrocarbonées hydrophobes. Les chaines, dont une est habituellement insaturée, comportent généralement plus de 16 atomes de carbone. La tête polaire est constituée d'un groupement phosphate, substituant la troisième fonction alcool du squelette glycérol. Le phosphate est suivi par un groupement alcool déterminant la classe du glycérophospholipide. Par exemple la phosphatidylcholine est un glycérophospholipide. Nous développerons plus loin, une famille de phospholipides prépondérante dans la vie cellulaire : les phosphoinositides.
- Les sphingolipides, ils sont composés d'un squelette de base sphingosine : un amino-alcool possédant une longue chaîne hydrocarbonée de 18 carbones portant une insaturation. Au niveau de la partie apolaire, un acide gras saturé (ou plus rarement insaturé) à longue

chaîne (le plus souvent de 18 à 24 carbones dans les sphingolipide de mammifères) est greffé sur la fonction amine par liaison amide, formant une céramide. Par exemple la sphingomyéline est un sphingolipide.

- Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols. Il est composé d'un squelette hydrocarboné de quatre cycles rigides et plans qui constitue la seule partie polaire de la molécule. Le noyau stérol se termine par une chaine de carbones. Le cholestérol s'insère dans la membrane entre les autres lipides. Il permet de rigidifier la membrane et il va moduler les propriétés dynamiques de celle-ci (**Kakorin et al. 2005; Ohvo-Rekilä et al. 2002**).

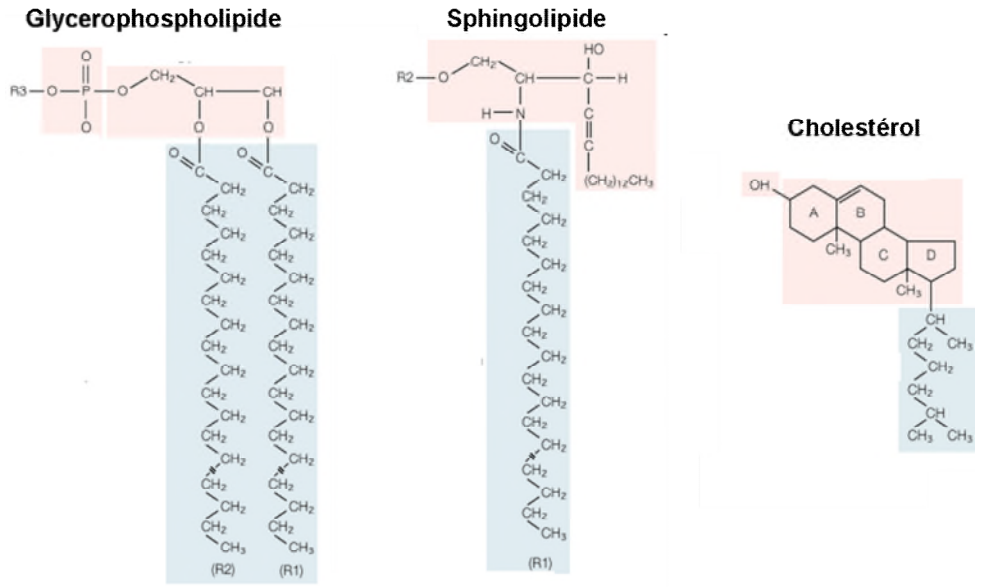



Fig I.A.3. Les trois types de lipides présents dans les membranes biologiques, adapté *d'Encyclopaedia Britannica*.

La composition lipidique des différentes membranes cellulaires est montrée sur la figure I.A.4.

La membrane plasmique constitue l'interface entre la cellule et son milieu. Elle assure donc à la fois un rôle de protection, en empêchant les molécules cellulaires de partir et les molécules extérieures d'entrer librement, et un rôle de barrière, en sélectionnant les éléments qui peuvent entrer ou sortir. Toutefois, ses fonctionnalités ne s'arrêtent pas là. La membrane et les molécules qui y sont associées permettent à la cellule de percevoir son environnement et d'agir sur lui. La membrane est donc un organite fondamental aux fonctions multiples.

Les protéines peuvent contribuer non seulement à la solidité de la membrane, mais surtout, elles remplissent des fonctions essentielles (échanges et communications). Les protéines

peuvent être complètement insérées dans la membrane, ce sont les protéines transmembranaires. Il existe de nombreux exemples de protéines qui traversent la membrane, les canaux ioniques par exemple (**Darnell et al. 1999**). Mais les protéines situées à la membrane ne sont pas toutes transmembranaires. Certaines protéines peuvent interagir avec des lipides spécifiques de la membrane ou d'autres protéines, *via* un domaine d'interaction, et ainsi se fixer sur celle-ci. La figure I.A.5 représente une vision plus réaliste de la membrane plasmique.

La charpente des membranes cellulaires est donc une construction supramoléculaire de lipides associés à des protéines.

**Major Lipid Components of Selected Biomembranes**

| | Composition (mol %) | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Source/Location** | **PC** | **PE + PS** | **SM** | **Cholesterol** |
| Plasma membrane (human erythrocytes) | 21 | 29 | 21 | 26 |
| Myelin membrane (human neurons) | 16 | 37 | 13 | 34 |
| Plasma membrane (*E. coli*) | 0 | 85 | 0 | 0 |
| Endoplasmic reticulum membrane (rat) | 54 | 26 | 5 | 7 |
| Golgi membrane (rat) | 45 | 20 | 13 | 13 |
| Inner mitochondrial membrane (rat) | 45 | 45 | 2 | 7 |
| Outer mitochondrial membrane (rat) | 34 | 46 | 2 | 11 |
| Primary leaflet location | Exoplasmic | Cytosolic | Exoplasmic | Both |

Fig I.A.4. Compositions lipidiques de différentes membranes cellulaires. Abréviations : (PC) phosphatidylcholine, (PE) phosphatidylethanolamine, (PS) phosphatidylsérine, (SM) shingomyeline. Adapté de Alberts et collaborateurs (**Alberts et al. 2008**).

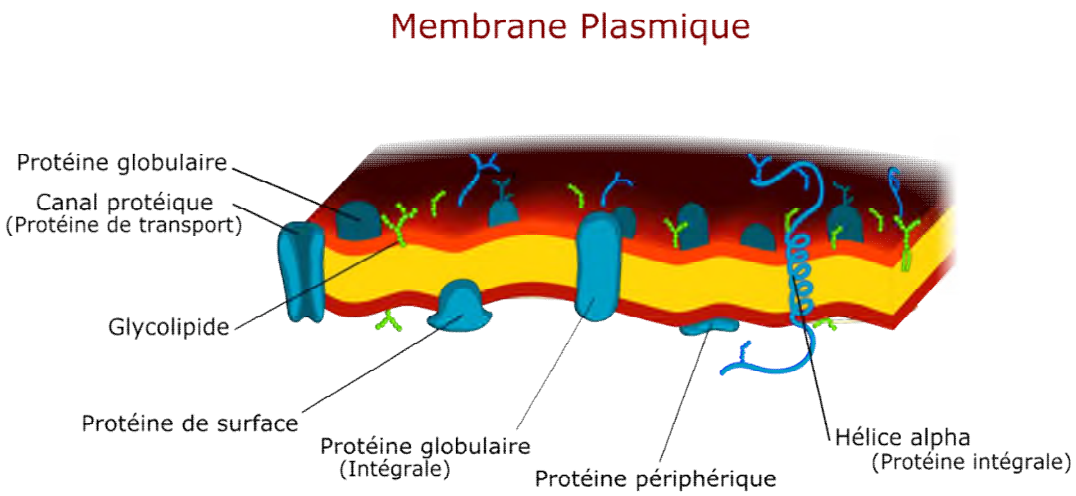



Fig I.A.5. Vision plus réaliste de la membrane plasmique. Elle est composée de lipides, de protéines et de sucres.

### *III.A.1.c – Dynamique moléculaire au sein de la membrane plasmique*

En 1972, Singer et Nicolson ont proposé un modèle moléculaire de la membrane dit « en mosaïque fluide » (**Singer et Nicolson 1972**). Ils décrivent la membrane comme un fluide bidimensionnel isotrope. En effet au dessus d'une certaines température $T_M$, dite de fusion des chaines, les lipides dans la membrane sont dans une phase fluide. La température $T_M$ dépend de la longueur des chaînes et de leur degré d'insaturation (*fig I.A.6*) (**Lipowsky et Sackmann 1995**).

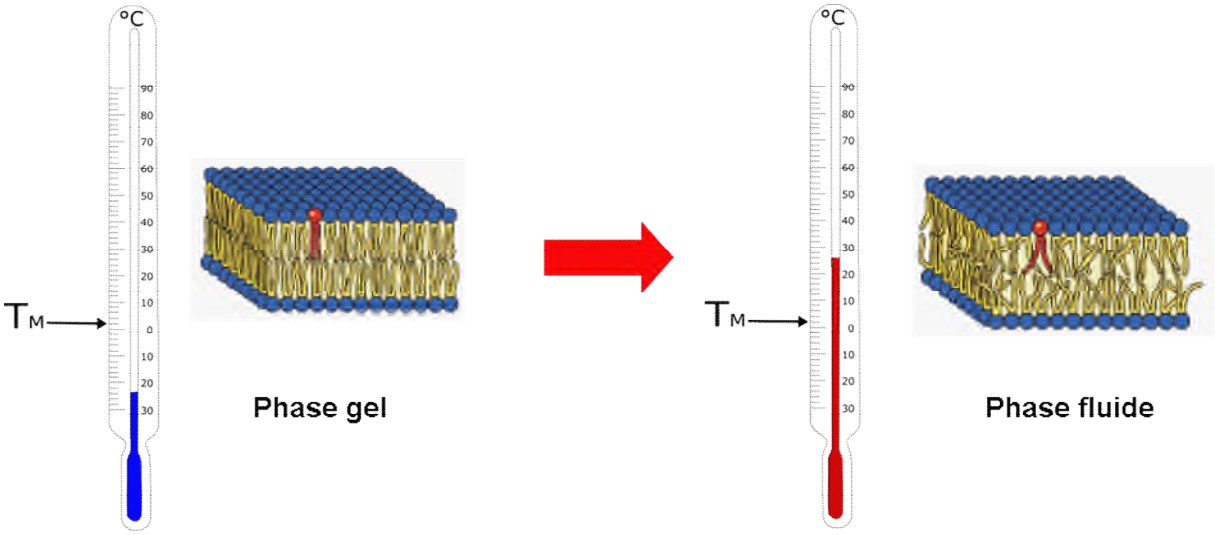



Fig I.A.6. Une bicouche lipidique peut être dans différentes phases : soit une phase gel en dessous de sa température de transition ou une phase fluide au dessus de cette température. Adapté de Lipowsky et Sackmann (**Lipowsky et Sackmann 1995**).

En dessous de la température $T_M$, les chaînes ont de fortes interactions hydrophobes. Les coefficients de diffusion sont très petits et il n'y a pratiquement pas de mouvement des lipides. Au dessus de la température $T_M$, les lipides sont dans une phase fluide moins ordonnée. Les lipides peuvent avoir plusieurs types de mouvement au sein de celle-ci (*fig I.A.7*) :

- Mouvement translationnel : le lipide se déplace dans le plan d'une des monocouches. Le coefficient de diffusion D a une valeur de l'ordre de $10^{-12} m^2/s$ (**Lipowsky et Sackmann 1995**)
- Mouvement rotationnel : le lipide peut tourner sur lui-même. Le coefficient de diffusion rotationnel $D_r$ est de l'ordre de $10^8 s^{-1}$ (**Lipowsky et Sackmann 1995**).

- Mouvement de basculement (ou « flip-flop ») : le lipide peut passer d'une monocouche à l'autre. C'est un phénomène qui reste lent car il est défavorable de faire passer la tête polaire dans la zone hydrophobe constituée par la queue des lipides. On a un coefficient $D_{basculement}$ de passage d'une monocouche à l'autre de l'ordre de $10^{-8}s^{-1}$ (**Alberts et al. 2008**). *In cellulo* il existe des enzymes, les flippases qui sont capables de favoriser ce mouvement.

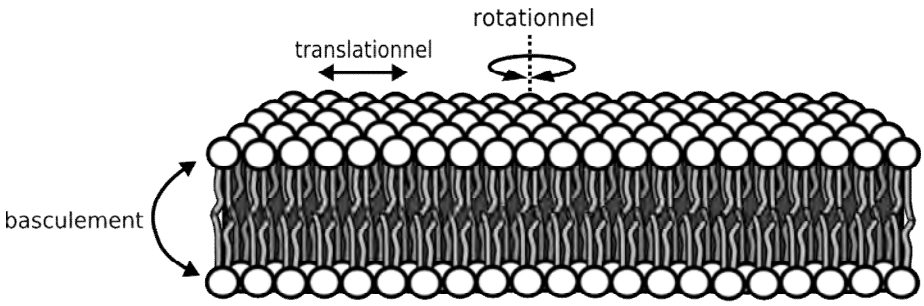



Fig I.A.7. Schéma de la membrane. Les flèches représentent les différents mouvements des lipides.

Les protéines présentes dans la membrane diffusent également mais beaucoup moins vite que les lipides (environ 100 fois moins vite). Dans ces conditions il faut quelques dizaines de minutes à un lipide pour faire le tour d'une cellule de 10 µm, alors que pour cette même cellule, une protéine peut mettre plusieurs jours. Le modèle en mosaïque fluide est envisagé de façon dynamique : les lipides et les protéines sont en perpétuel mouvement via le mouvement brownien.

Depuis les années 1970, le modèle de mosaïque fluide a considérablement évolué. Les biologistes et les biophysiciens ont été amenés à repenser le modèle original et à entrevoir un aspect fonctionnel dans la dynamique et la composition de la membrane. De nombreuses protéines membranaires ne diffusent pas librement dans la membrane, elles sont confinées à l'intérieur de domaines bien spécifiques, ou bien, elles peuvent avoir un mouvement dirigé. De nombreuses études montrent désormais qu'il existe une forte hétérogénéité latérale membranaire avec l'existence de micro-domaines dans des phases différentes (**Vereb et al. 2003; Simson et al. 1995; Sheets et al. 1995**).

**Les membranes biologiques sont très dynamiques. Elles contiennent des protéines et des lipides régulateurs qui sont des acteurs de la vie cellulaire. La membrane est un support pour les interactions entre les constituants du cytosol et ceux qui se trouvent insérés dans la membrane.**

Nous nous intéressons maintenant plus particulièrement à une catégorie de lipides membranaires, les phosphoinositides.

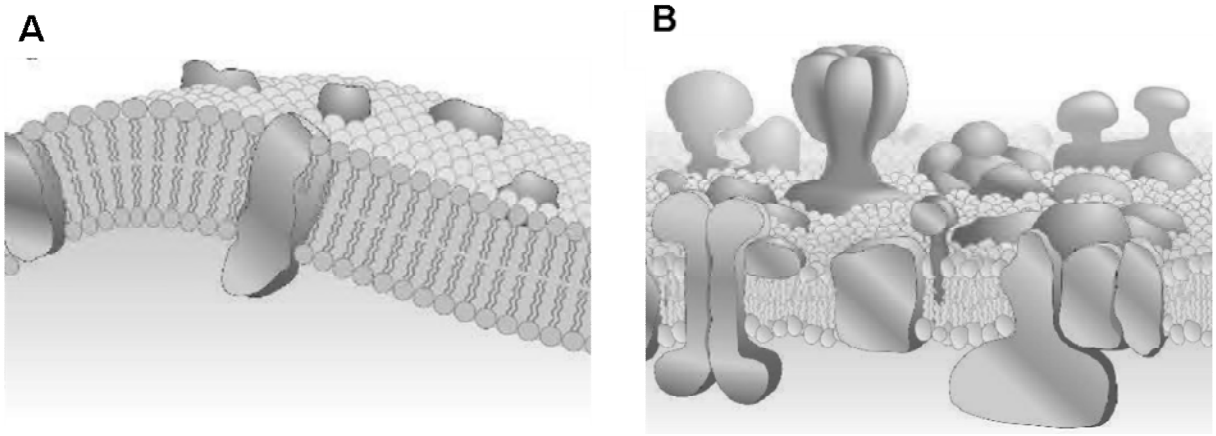



Fig I.A.8. Schéma de la membrane. (A) Modèle proposé par Nicholson, (B) vision moderne de la membrane plasmique : la membrane n'est plus seulement un fluide bidimensionnel mais elle est vue comme une entité formée de domaines (une mosaïque). Adapté de Engelman (**Engelman 2005**).

## II.A.2 – Les phosphoinositides : médiateurs et acteurs clés de la signalisation cellulaire.

Les phosphoinositides sont des phospholipides chargés négativement de type glycérophospholipides anioniques présents dans de nombreuses membranes internes. Ces molécules sont composées d'un groupement phosphatidyl (deux acides gras estérifiés sur une molécules de glycérol, elle-même liée de façon covalente à un acide phosphorique) dont le groupement phosphate est associé à une molécule d'inositol, un polyol cyclique (*fig I.A.9*).

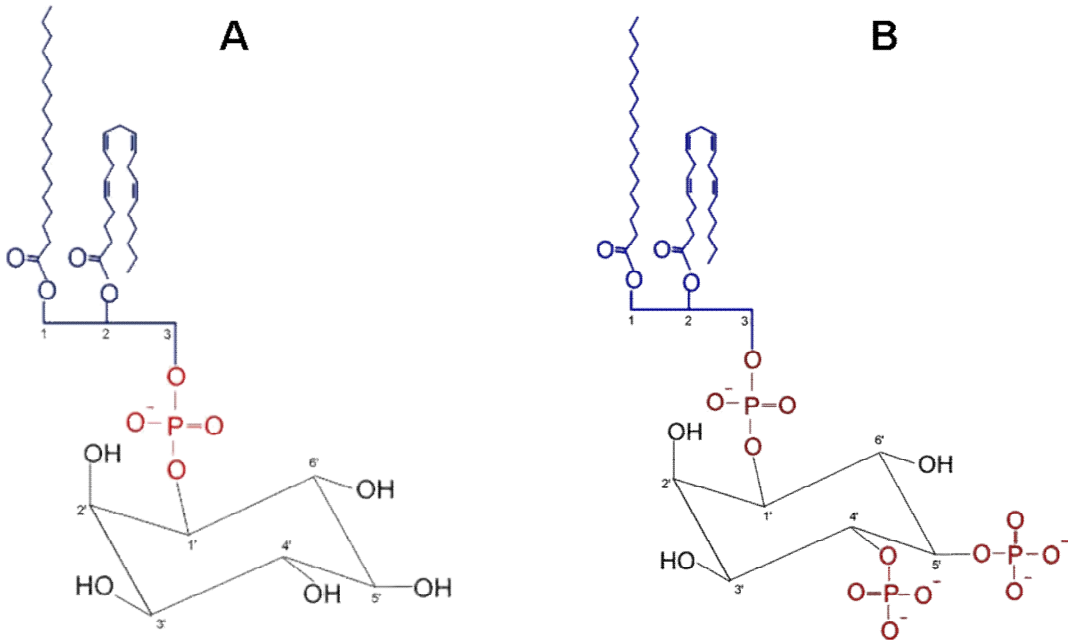



Fig I.A.9. Schéma du (A) phosphatidylinositol (Pi) et (B) du phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP2).

### *II.A.2.a – Présentation des phosphoinositides les plus courants.*

Les Phosphoinositides (abréviation PtdIns) représentent entre 10 et 15 % des phospholipides membranaires totaux (**Alberts et al. 2008**). Ils sont au nombre de huit et sont classés selon la position et le nombre de groupements phosphates présents sur le noyau inositol. Ce noyau inositol contient cinq groupements hydroxyles libres mais seulement trois de ces positions (3,4 ou 5) peuvent être phosphorylées *in vivo.* La figure I.A.10 montre les différentes voies de synthèses des phosphoinositides à partir du précurseur, le Phosphatidylinositol phosphate (PI). Ce cycle de synthèse est appelé « cycle canonique » des phosphoinositides (**Payrastre et al. 2001**).

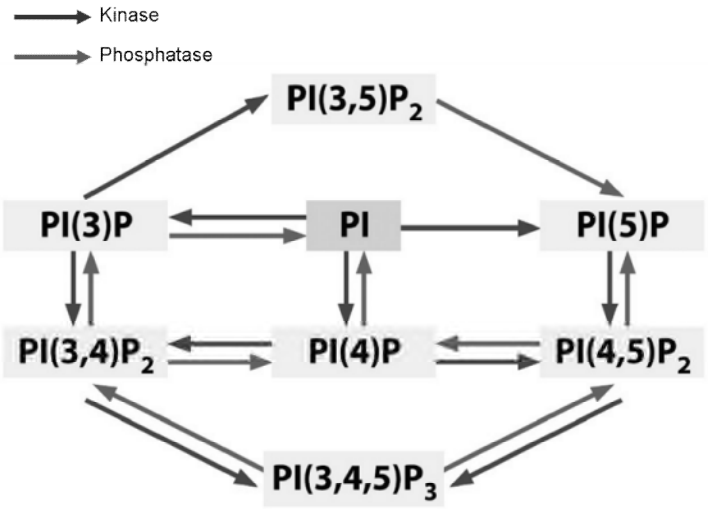



Fig I.A.10. Voies de synthèse des phosphoinositides et inter-conversions. Les cadres représentent les différents phosphoinositides et les flèches représentent des kinases ou des phosphatases. Adapté de Alberts et collaborateurs (**Alberts et al. 2008**).

La molécule d'inositol est phosphorylée pour former la famille des phosphoinositides :

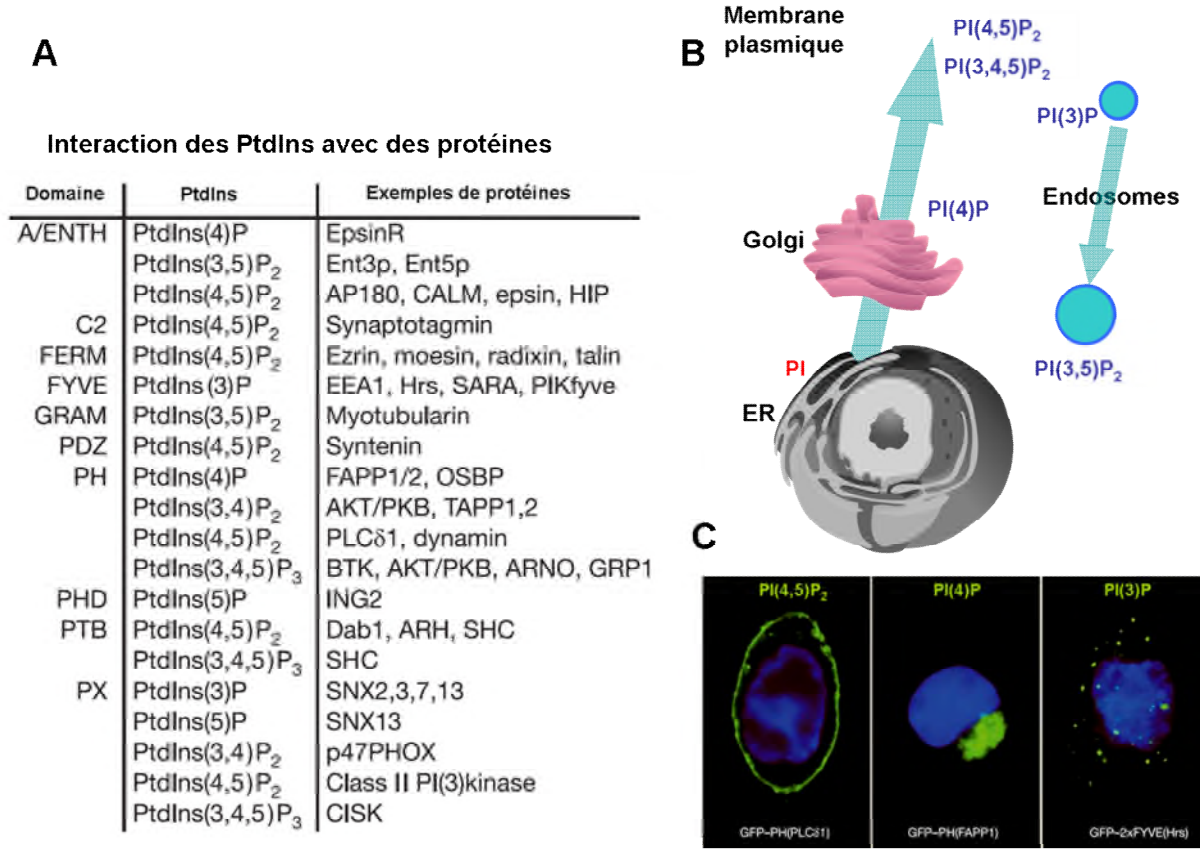
- Le phosphatidylinositol (*n*) phosphate, le PI(*n*)P, avec *n* qui représente la position du carbone sur lequel est situé le groupement phosphate : PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P
- Le phosphatidylinositol (*n*, *m*) bi phosphate, PI(*n*,*m*)$P_2$, avec *n* et *m* qui représentent les positions des carbones sur lesquels sont situés les groupements phosphate : PI(3,4)$P_2$, PI(4,5)$P_2$, PI(3,5)$P_2$.
- Le phosphatidylinositol (*n*, *m*, *z*) tri phosphate, le PI(*n*,*m*,z)$P_3$, avec *n*, *m* et *z* qui représentent les positions des carbones sur lesquels sont situés les groupements phosphate : PI(3,4,5)$P_3$.

Le plus abondant des PtdIns, en dehors du PI qui représente environ 15 % des phosphoinositides totaux, est le PIP2. Il représente environ 1 % à 2 % des phospholipides (**Alberts et al. 2008**). Les autres poly-phosphoinositides représentent moins de 1 % des phosphoinositides totaux (**Di Paolo et De Camilli 2006**). Dans les cellules eucaryotes, il est classiquement admis que le PI, le PI4P et le PI(4,5)$P_2$ sont maintenus à des niveaux relativement constants dans le feuillet interne de la membrane plasmique par des réactions de phosphorylation/déphosphorylation dépendantes de kinases et phosphatases qui ne sont pas toutes identifiées à ce jour. Le maintien de cet équilibre représente jusqu'à 7% de la consommation basale d'ATP (**Verhoeven et al. 1987; Verhoeven et al. 1987**).

## *II.A.2.b – Aperçu de la localisation et des différents rôles de chacun des PtdIns.*

Les phosphoinositides sont localisés dans plusieurs types de membranes intracellulaires, en fonction de leur nature, et ont des rôles différents.

Les PtdIns interagissent avec de nombreuses protéines via des domaines protéiques spécifiques dont un grand nombre a été décrit dans la littérature (*fig I.A.11*).




Interaction des PtdIns avec des protéines

| Domaine | PtdIns | Exemples de protéines |
|---|---|---|
| A/ENTH | PtdIns(4)P | EpsinR |
| | PtdIns(3,5)$P_2$ | Ent3p, Ent5p |
| | PtdIns(4,5)$P_2$ | AP180, CALM, epsin, HIP |
| C2 | PtdIns(4,5)$P_2$ | Synaptotagmin |
| FERM | PtdIns(4,5)$P_2$ | Ezrin, moesin, radixin, talin |
| FYVE | PtdIns(3)P | EEA1, Hrs, SARA, PIKfyve |
| GRAM | PtdIns(3,5)$P_2$ | Myotubularin |
| PDZ | PtdIns(4,5)$P_2$ | Syntenin |
| PH | PtdIns(4)P | FAPP1/2, OSBP |
| | PtdIns(3,4)$P_2$ | AKT/PKB, TAPP1,2 |
| | PtdIns(4,5)$P_2$ | PLCδ1, dynamin |
| | PtdIns(3,4,5)$P_3$ | BTK, AKT/PKB, ARNO, GRP1 |
| PHD | PtdIns(5)P | ING2 |
| PTB | PtdIns(4,5)$P_2$ | Dab1, ARH, SHC |
| | PtdIns(3,4,5)$P_3$ | SHC |
| PX | PtdIns(3)P | SNX2,3,7,13 |
| | PtdIns(5)P | SNX13 |
| | PtdIns(3,4)$P_2$ | p47PHOX |
| | PtdIns(4,5)$P_2$ | Class II PI(3)kinase |
| | PtdIns(3,4,5)$P_3$ | CISK |

Fig I.A.11. (A) Tableau présentant différents domaines protéiques interagissant avec des PtdIns ainsi que les protéines connues pour interagir via ces domaines. (B) Schéma de la cellule indiquant la localisation préférentielle de certains phosphoinositides dans les différents types de membranes internes. (C) Exemple de cellules provenant d'ovaire de hamster, marquées en fluorescence. Le noyau est marqué en bleu. Les phosphoinositides sont marqués en vert. Le domaine « pleckstrin homology » (PH) révèle la localisation du PIP2 et du Pi(4)P, le domaine FYVE révèle la localisation du Pi(3)P. Adapté de Di Paolo et collaborateurs (**Di Paolo et De Camilli 2006**).

La localisation cellulaire et un aperçu du rôle respectifs de chaque PtdIns sont présentés.

- Le PI, synthétisé dans le réticulum endoplasmique, est ensuite est transporté jusque dans l'appareil de golgi et jusqu'à la membrane plasmique à l'aide de transport vésiculaire ou bien à l'aide de protéines. Une fois dans les différents compartiments cellulaires, le PI va subir des

modifications afin de donner différents phosphoinositides (*fig I.A.10*). Le PI ne semble pas avoir de rôle direct dans la régulation de la signalisation cellulaire.

- Le PI(3)P est présent à des taux constants au niveau des endosomes précoces. Le PI(4)P est situé au niveau de l'appareil de golgi. Il est primordial pour le réseau trans-golgien et le transport vésiculaire car il permet à certaines protéines d'interagir sur les membranes (**Walch-Solimena et al. 1999; Hama et al. 1999**). Le PI(5)P est le PtdIns monophosphate découvert le plus tardivement (**Rameh et al. 1997**). Il est localisé dans le noyau et il serait important dans la réponse des cellules aux contraintes (**Clarke et al. 2001**).

- Le $PIP_3$ et le $PI(3,4)P_2$ sont des PtdIns minoritaires dans la membrane des cellules. Ils sont produits de façon rapide et transitoire au niveau de la membrane plasmique. Ils sont impliqués dans la survie, la motilité, la réorganisation du cytosquelette (**Payrastre et al. 2001; Czech 2000**). Le PI(3,5)P2 est le plus récent des PtdIns biphosphates identifié. A ce jour, il a été identifié comme étant impliqué dans le trafic vésiculaire et le recyclage des protéines des corps vésiculaires, vacuolaires et lysosomaux (**Michell et al. 2006**).

Le phosphoinositide qui nous intéresse le plus est le $PI(4,5)P_2$, que nous noterons communément PIP2 par la suite. Le rôle du PIP2 est développé au paragraphe suivant.

### ***II.A.2.c – Un lipide régulateur clé : le Phosphatidylinositol(4,5)biphosphate (PIP2).***

Le PIP2 ne représente que 1 % à 2 % des phosphoinositides dans les membranes mais ses rôles sont nombreux et importants : il est capable d'activer des canaux ioniques (**Suh et al. 2008**), des enzymes (**Sciorra et al. 2002**) et entre en jeu dans nombre de mécanismes cellulaires impliquant des réorganisations du cytosquelette (**Di Paolo et De Camilli 2006**). Il est principalement localisé au niveau de la membrane plasmique (**Di Paolo et De Camilli 2006**), mais il est également localisé au niveau de la membrane nucléaire (**Manzoli et al. 1989**, **Mazzotti et al. 1995**).

Le PIP2 est un phospholipide anionique, dont la charge dépend de paramètres externes tels que le pH ou la présence de protéines. Néanmoins dans une gamme de pH comprise entre 6.7 et 7.7, la charge du PIP2 est de -3 (-1 correspond à la charge d'un groupement phosphate) (**McLaughlin et al. 2002**). Il existe trois états de protonation du PIP2 suivant le pH. Pour un pH supérieur à 6.7, c'est le groupement phosphate situé sur le carbone 4 qui est protoné, et pour un pH supérieur à 7.7 c'est le groupement phosphate sur le carbone 5 qui protoné à son tour (**Fernandes et al. 2006**). De plus, sa géométrie indique qu'il forme spontanément des

micelles en solution. En effet, il possède une tête polaire grande par rapport au volume des chaines hydrocarbonées (**Sugiura 1981**). Les structures formées par les associations de lipides sont assez variées et très sensibles à la forme des molécules individuelles. Il est convenable d'utiliser un paramètre *P*, dit critère stérique d'auto-association, qui dépend de la surface *S* de la tête polaire, du volume *V* occupé par les chaines carbonées et la longueur *l* de celles-ci (*fig I.A.12*).

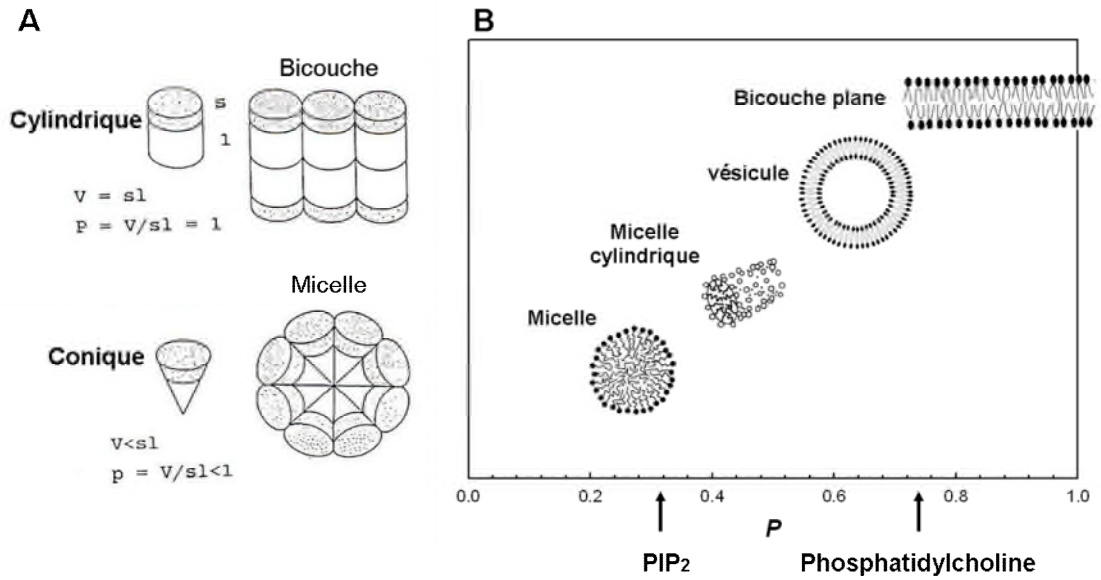



Fig I.A.12. (A) Schéma représentant la forme moyenne d'un lipide et du type d'association formée. (B) Associations formées par les lipides en fonctions du critère d'association stérique *P*. L'emplacement du PI(3,4)$P_2$ et du DOPC sont montrés par une flèche (**Sugiura 1981**). Le PI(4,5)$P_2$ n'est pas différents en taille et en géométrie du PI(3,4)$P_2$. Adapté de Israelachvili (**Israelachvili 1991**) et de Sugiura (**Sugiura 1981**).

La concentration micellaire critique (cmc) du PIP2 est comprise entre 10 µM et 60 µM. Le tableau I.A donne un aperçu des études qui ont mesuré la concentration micellaire critique du PIP2. Toutes les études mesurant la concentration micellaire critique du PIP2 ont été réalisées dans des milieux pauvrement ioniques (quelques millimolaires de sels). Lorsque le milieu d'étude est un milieu physiologique, c'est-à-dire avec 150 mM de sels, on s'attend à ce que la cmc diminue. En effet, les différentes charges des lipides sont écrantés et la formation de micelles est facilitée.

Le PIP2 participe à la régulation du cytosquelette d'actine au niveau de la membrane. Par exemple, il est connu que la nucléation de la polymérisation d'actine dans les lamellipodes *via* un nucléateur, Arp2/3, fait intervenir le PIP2. Le PIP2 se lie a la protéine N-WASP qui va alors activer Arp 2/3 (**Janmey et al. 2004**). Il existe d'autres protéines activatrices de N-

WASP qui peuvent être recrutées à la membrane via une liaison au PIP2, ce qui va amplifier l'effet du lipide sur la régulation de l'actine.

| Etudes | Milieu | Technique | cmc |
|---|---|---|---|
| (**Palmer 1981**) | Extrait cellulaire | Gel filtration | 30 µM |
| (**Huang et al. 1991**) | Tris 20 mM, pH = 7.5 | Comassie | 10 µM |
| (**Lee et al. 2003**) | Mes 20 mM, pH = 6.5, 5 µM 1,6-diphenyl-1,3,5 hexatriene | Fluorescence du 1,6-diphenyl 1,3,5- hexatriene | 12.5 µM |
| (**Moens et al. 2007**) | $H_2O$ | Diffusion de lumière à 350 nm Diffusion dynamique de lumière | 30 – 60 µM |

Tableau I.A. Etudes mesurant la cmc du PIP2.

Le lipide régulateur peut également interagir avec les protéines dites « ABP » (Actin Binding Proteins). Par exemple, il interagit avec la profiline (**Malm et al. 1983**), dont il aide la dissociation du monomère d'actine, favorisant ainsi la présence de monomères libres. De plus il interagit également avec des protéines de coiffe des filaments d'actine (gelsoline, CapZ), et favorise l'élongation des filaments (**Pollard et al. 2003**).

Le PIP2 est un acteur majeur dans la régulation de différentes voies de signalisation (**Toker 1998**). En effet il est le précurseur de seconds messagers, en tant que substrat de la phospholipase C pour donner le diacylglycérol et l'$IP_3$. Le diacylglycérol et l'$IP_3$, à leur tour, vont permettre la modification de la concentration de calcium dans la cellule, ainsi que le recrutement et l'activation de la protéine kinase C à la membrane (**Berridge et al. 1984**).

De plus, le PIP2 est nécessaire à l'activation de certains canaux ioniques (**Suh et al. 2008**). En effet, Hilgemann et collaborateurs pensent que le lipide n'étant présent que dans la membrane plasmique, les canaux ioniques ne seront actifs que dans la membrane plasmique (**Hilgemann 2007**). L'activité de la phospholipase C peut réguler l'activation de certains canaux ioniques : la phospholipase C hydrolyse le PIP2 qui n'est alors plus apte à agir sur les canaux ioniques (**Suh et al. 2008**). La figure I.A.13 donne un aperçu des différents rôles du PIP2 au sein d'une cellule. Le PIP2 interagit également avec des protéines qui jouent le rôle d'adaptateur entre le cytosquelette et le milieu extérieur. Par exemple, il interagit avec des protéines contenant un domaine d'interaction spécifique (*fig I.A.11*), celles-ci pouvant alors interagir avec le cytosquelette ou bien avec des intégrines ou d'autres récepteurs d'adhésion.

**Les Phosphoinositides font partie des acteurs majeurs dans la cellule. Leur localisation et leur production sont finement régulées par des processus complexes. Nous nous**

**sommes intéressés au PIP2 qui semble primordial pour beaucoup de phénomènes intervenant à la membrane.**

A

| Fonction | Mécanisme possible |
|---|---|
| *Trafic membranaire* (1) | |
| Endocytose | Recrutement de protéines spécifiques à la membrane. |
| Exocytose | |
| *Interface entre la membrane et le cytosquelette* (2) | |
| Formation de microvilli | Activation des protéines ERM. Interaction avec des protéines régulatrices du cytosquelette (profiline, gelsoline etc..). |
| Ancrage du cytosquelette à la membrane | |
| Phagocytose | Régulation de l'activité de certaines protéines (ARF6 par exemple) |
| *Signalisation cellulaire* (3) | |
| Activation d'enzymes | Production de seconds messagers comme de l'IP3 ou du diaglycérol |
| Activation de canaux ioniques | |

B

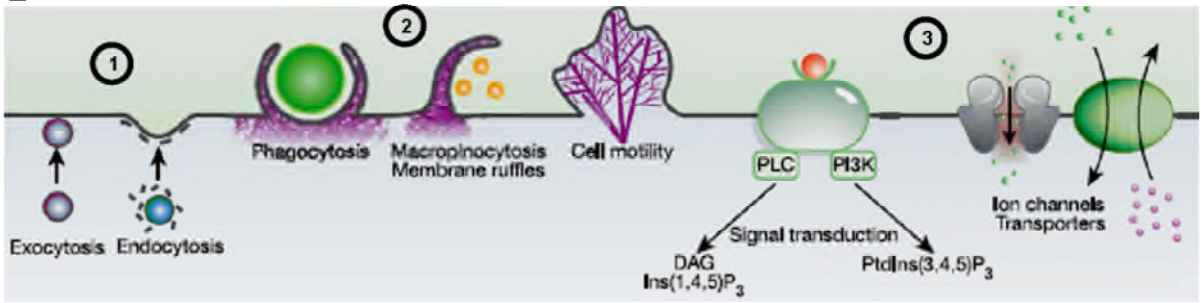



Fig I.A.13. (A) Tableau récapitulatif des différentes fonctions du PIP2 au sein de la cellule. (B) Schéma illustrant les différents phénomènes impliquant le PIP2 à la membrane. Adapté de Di Paolo (**Di Paolo et De Camilli 2006**) et Czech (**Czech 2003**).

Un des phénomènes qui semble particulièrement intéressant est l'interaction entre le PIP2 et une protéine d'ancrage de la membrane plasmique au cytosquelette : l'ezrine. Dans les parties suivantes nous allons introduire l'ezrine et les interactions de celles-ci avec le PIP2 et avec l'actine.

## II.A.3 –Les protéines ERM (Ezrine, Radixine, Moesine).

Les ERM sont des protéines qui interagissent avec la membrane plasmique et les filaments d'actine. Elles permettent un lien direct entre le cytosquelette d'actine directement à la membrane *via* des domaines d'interactions spécifiques (**Algrain et al. 1993**).

### *II.A.3.a – Description et structure des ERM.*

La famille des ERM regroupe 4 protéines : l'ezrine, la radixine, la moesine et la merline (ou schwanomine). Les protéines ERM ont un haut pourcentage d'homologie de séquence entre elles et sont relativement bien conservées dans le règne animal (*figA.I.14*).

Les ERM sont constituées d'un domaine N-terminal appelé domaine FERM (4.1 ezrin-radixin-moesin) (**Chishti et al. 1998**) globulaire de 300 acides aminés (a.a) suivi d'une région d'environ 200 a.a qui forment une hélice-α, puis de la région C-terminale composée de 100 a.a environ.

Le domaine FERM est composé de trois globules (F1, F2, F3) formant un trèfle (*fig A.I.15*). Il a été montré que le domaine FERM interagit avec le PIP2 (**Niggli et al. 1995; Hirao et al. 1996**). Le site d'interaction a été localisé dans une poche située entre le domaine F1 et F3 du domaine FERM (**Barret et al. 2000; Hamada et al. 2000**). Le domaine FERM interagit également avec beaucoup de protéines membranaires (CD44 ; CD43, ICAM, EBP50 etc..) (**Tsukita et al. 1999**).

Le domaine C-terminal des ERM interagit avec les filaments d'actine (**Turunen et al. 1994**). La merline ne possède pas, contrairement aux autres ERM, de domaine de liaison à l'actine dans sa partie C-terminale, mais se lie à l'actine et aux microtubules par son domaine FERM (**Brault et al. 2001; Sun et al. 2002**). De plus, la merline est associé à l'actine *via* sa liaison aux protéines du cytosquelette telles que la ßII spectrine (**Scoles et al. 1998**).

L'ezrine la radixine et la merline, présentent un domaine poly-proline (PP) dont la fonction n'est pas connue.

Les ERM sont capables d'adopter une conformation ouverte ou une conformation fermée résultant de l'interaction du domaine FERM et du domaine C-terminal. On parle parfois de N-ERMAD et C-ERMAD pour ERM-Association Domain) (**Pearson et al. 2000; Gary et al. 1995**) (*fig A.I.14*). Ces interactions intramoléculaires masquent des sites de liaison à d'autres

protéines. Aussi l'activité des ERM est régulée par leur état ouvert ou fermé et ces conformations sont responsables de la localisation subcellulaire de ces protéines.

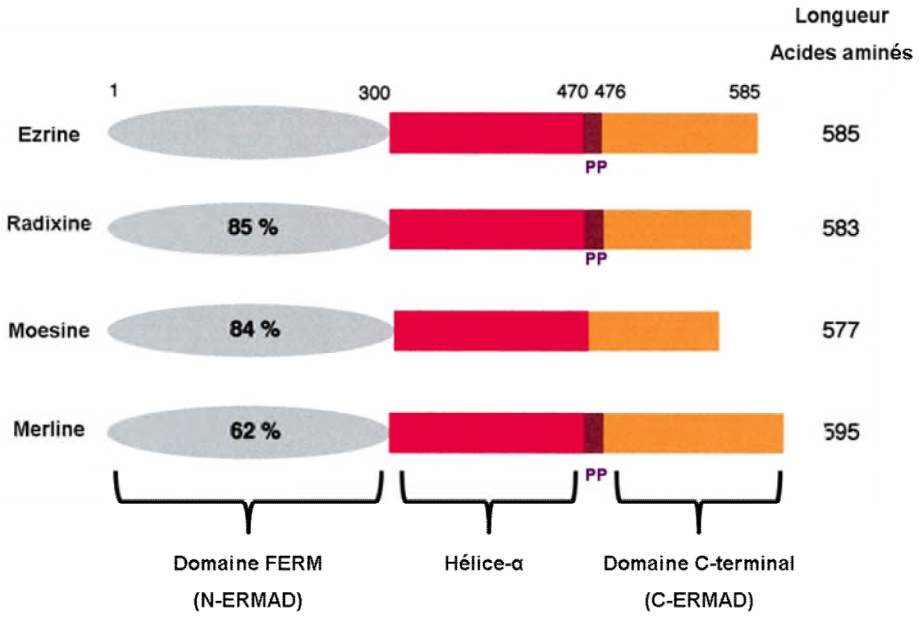



Fig A.I.14. Structure des protéines ERM. Elles sont composées d'un domaine FERM, d'une hélice-α et d'un domaine C-terminal. Les pourcentages représentent les pourcentages d'homologie de séquence des différentes protéines entre elles. PP représente le domaine poly-proline. Adapté de Louvet-Vallée (**Louvet-Vallée 2000**).

### ***II.A.3.b – La régulation des ERM***

Pour l'ezrine, la radixine et la moesine, la conformation ouverte est considérée comme la forme active de ces protéines, c'est à dire qu'elles peuvent alors se lier à l'actine. Au contraire, pour la merline, c'est la conformation fermée qui est considérée comme la forme active c'est-à-dire la forme qui est capable d'inhiber la prolifération cellulaire. Le repliement des ERM dépend de deux choses : leur état de phosphorylation et la liaison de la protéine au PIP2.

#### ***II.A.3.b.1. La Phosphorylation dans la régulation des ERM***

La phosphorylation des ERM est contrôlée par des membres de la famille Ras des petites GTPases, respectivement Rac1 et RhoA (**Auvinen et al. 2007**). Les membres de cette famille de protéines sont connus pour leur activité au niveau du remodelage du cytosquelette d'actine. L'activation des kinases effectrices par RhoA conduit à la phosphorylation du résidu thréonine de l'extrémité C-Terminale (T567 dans l'ezrine) (**Matsui et al. 1998**). Néanmoins un autre site de phosphorylation de l'ezrine a été identifié par Yand et collaborateurs. Les ERM activées peuvent interagir avec le cytosquelette d'actine via leur extrémité C-Terminale et avec les

protéines transmembranaires, comme CD44 par exemple, via leur domaine FERM (**Turunen, et al. 1994; Mori et al. 2008**). Les ERM peuvent réaliser un contrôle négatif sur l'activité Rho et ainsi limiter leur propre activation. Les protéines Rho limitent leur activité par activation des ERM (**Hirao et al. 1996**).

***II.A.3.b.2. Le PIP2 dans la régulation des ERM***

Le métabolisme des phospholipides joue un rôle dans la régulation de l'activité des protéines ERM. En effet, une interaction directe entre le domaine FERM des ERM et le PIP2 a été montrée et identifiée comme nécessaire à la phosphorylation (**Hirao et al. 1996; Barret et al. 2000; Fievet et al. 2004**). Fievet et collaborateurs montrent que l'activation des ERM intervient d'une façon séquentielle avec en premier la liaison au PIP2, puis une phosphorylation sur le résidu thréonine 567. Cette vision de l'activation des ERM est appuyée par une étude de Chambers et collaborateurs (**Chambers et al. 2005**) qui montrent que le mutant T567D phosphomimétique de l'ezrine, sur lequel le résidu thréonine 567 est muté en asparagine, n'est pas une forme complètement active (« ouverte ») de l'ezrine. Le double mutant phosphomimétique (T567D et T235E) apparaît être une forme active de la protéine (**Ilani et al. 2007**). Le site d'interaction du PIP2 sur le domaine FERM a été identifié grâce à Barret et collaborateur (**Barret et al. 2000**). Les auteurs ont montré que l'interaction entre l'ezrine et des vésicules multilamellaires contenant du PIP2 ainsi que l'interaction entre l'ezrine avec la membrane plasmique sont pratiquement abolies par la mutation de certains acides aminés situés dans les lobes F1 et F3 du domaine FERM (*fig A.I.15*). Une autre incursion dans la structure du domaine FERM est venue de la détermination de la structure, par rayon X, de la radixine complexée avec l'IP3 (**Hamada et al. 2000**) (*fig A.I.15*). Les auteurs ont montrés que certains acides aminés positifs (*fig A.I.15*) pourraient être importants pour l'interaction entre le domaine FERM et le PIP2 / $IP_3$. De plus, les auteurs évoquent également un déplacement des certaines structures au sein du domaine.

Le PIP2 pourrait ainsi favoriser l'ouverture des ERM, la phosphorylation intervenant ensuite afin de possiblement stabiliser la forme ouverte et active. Pour la merline, aucune étude similaire n'a été conduite. Néanmoins, puisque les sites de liaison PIP2 existent également au niveau du domaine FERM, il est envisageable qu'une régulation similaire existe.

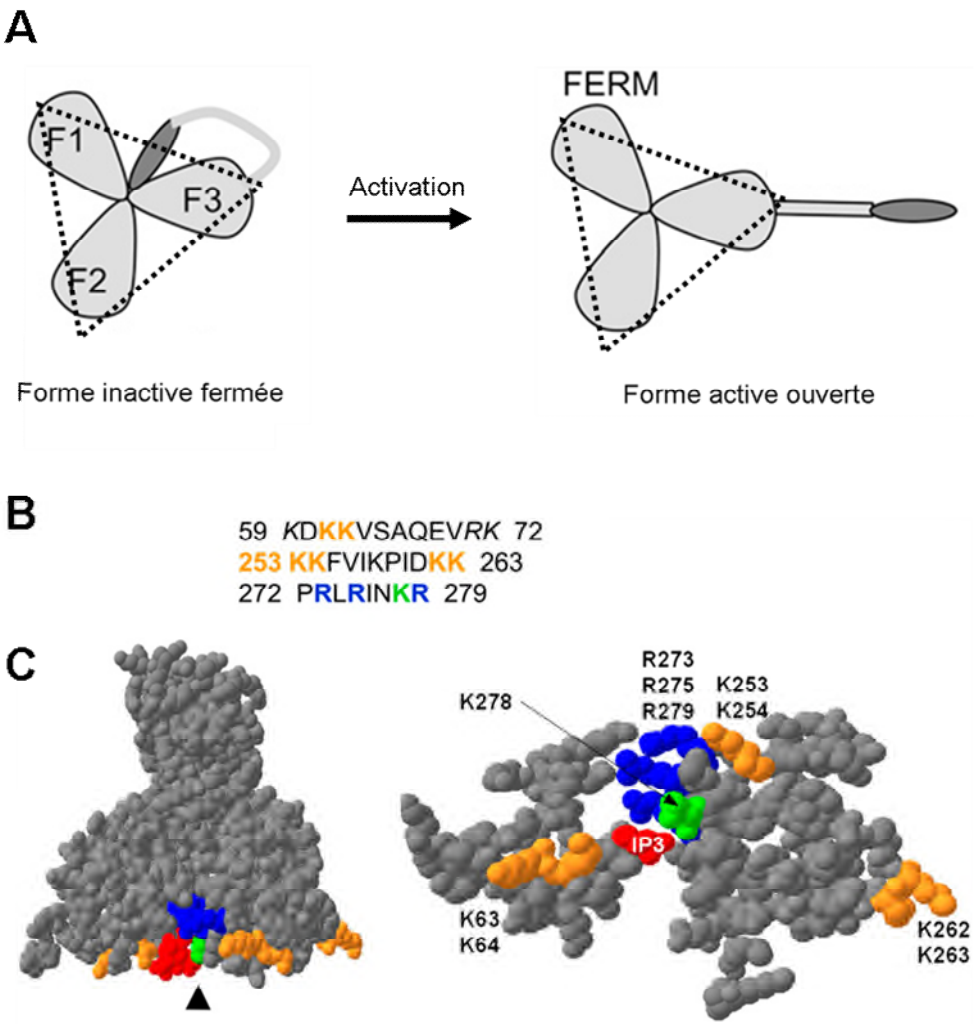



Fig I.A.15. (A) Schéma représentant la structure du domaine FERM et le changement conformationnel de la protéine lors de l'activation de celle-ci. Les trois lobes (F1, F2, F3) représentent le domaine FERM. Dans la suite de l'exposé, le domaine FERM sera représenté comme un triangle englobant les trois lobes. Ce triangle est représenté en pointillés. (B) Séquence primaire des acides aminées composant l'ezrine dans les sous domaines F1 et F3. Le site potentiel de liaison au PIP2 a été identifié par mutagenèse comme 6 paires de lysines (K63, K64, K252, K253, K262, K263) représentés en orange (**Barret et al. 2000**). Les résidus positifs identifiés par Hamada et collaborateurs sont également représentés en bleu (**Hamada et al. 2000**). (C) A droite, visualisation tridimensionnelle du domaine FERM à l'aide de SPDB viewer 3.7 (Protein Data Bank 1GC6). A gauche, coupe de 10 angströms d'épaisseur du domaine FERM dans la direction de la flèche, les acides aminés important pour l'interaction sont tous situés dans le même plan. Adapté de Blin et collaborateurs (**Blin et al. 2008**).

### ***II.A.3.c – Les fonctions des ERM***

La régulation de l'interaction entre la membrane et le cytosquelette est primordiale dans beaucoup de processus. Outre leur implication dans la morphogenèse cellulaire, les ERM sont aussi impliquées dans l'adhésion, la motilité et la signalisation.

### *II.A.3.c.1 – Localisation des ERM*

Les ERM sont localisées sous la membrane plasmique dans des microstructures cellulaires riches en actine (**Berryman et al. 1993; Franck et al. 1993**). Par exemple, dans la partie apicale des cellules épithéliales, les protéines ERM participent au maintien de la structure (*fig I.A.16*). La surface « en brosse » des cellules épithéliales est composée d'environ un millier de microvillosités d'une épaisseur de 0.2 µm et d'une longueur de 1 µm. Les microvillosités se caractérisent par une organisation très structurée comme le prouve l'extrême régularité de leur diamètre, de leur longueur et de leur répartition. Elles sont constituées de 20 à 30 filaments d'actine qui sont maintenu ensemble par des protéines (villine, fibrine etc..).

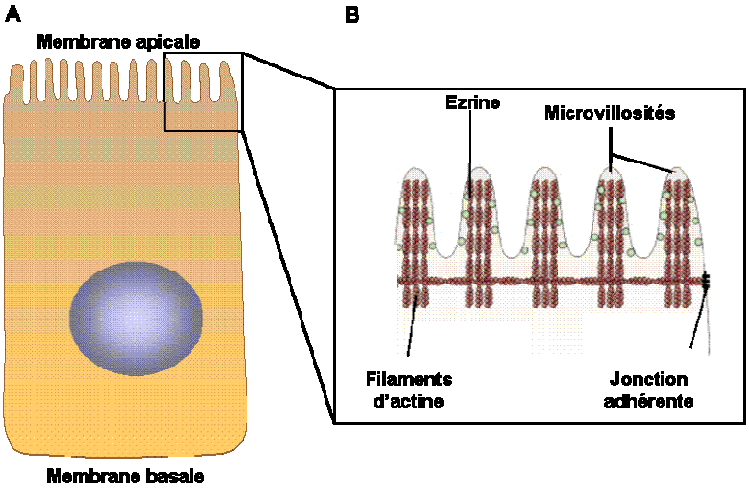



Fig I.A.16. Schéma d'une cellule épithéliale. La cellule est polarisée et l'ezrine se trouve dans la zone apicale formée de microvillosités. Adapté de Bretscher et collaborateurs (**Bretscher et al. 2002**)

Chez les vertébrés, il existe des localisations différentes pour chaque ERM. L'ezrine a été la première ERM identifiée comme étant la protéine majeure dans les cellules épithéliales (**Bretscher 1983**). La radixine a été purifiée à partir de cellules de foie où elle est également présente dans les jonctions adhérentes ainsi que dans l'anneau contractile d'actine durant la cytokinèse (**Hieda et al. 1989; Sato et al. 1991**). La moesine est co-exprimée avec l'ezrine, dans les cellules endothéliales et dans les leucocytes (**Berryman et al. 1993**).

### *II.A.3.c.2 – Aperçu des fonctions biologiques des ERM : expériences in cellulo*

*In cellulo*, la fonction des ERM semble dépendre du type cellulaire. Toutes les cellules expriment les ERM par couple (il y a toujours deux ERM exprimées au sein de la cellule). Ceci suggère une redondance dans leurs fonctions. Les ERM intervenant dans nombre de

voies de signalisation  et dans l'attachement du cytosquelette à la membrane. Sa fonction va être centrale dans les phénomènes tels que la polarité cellulaire, la migration cellulaire et la morphogénèse en général (*fig A.I.17*).

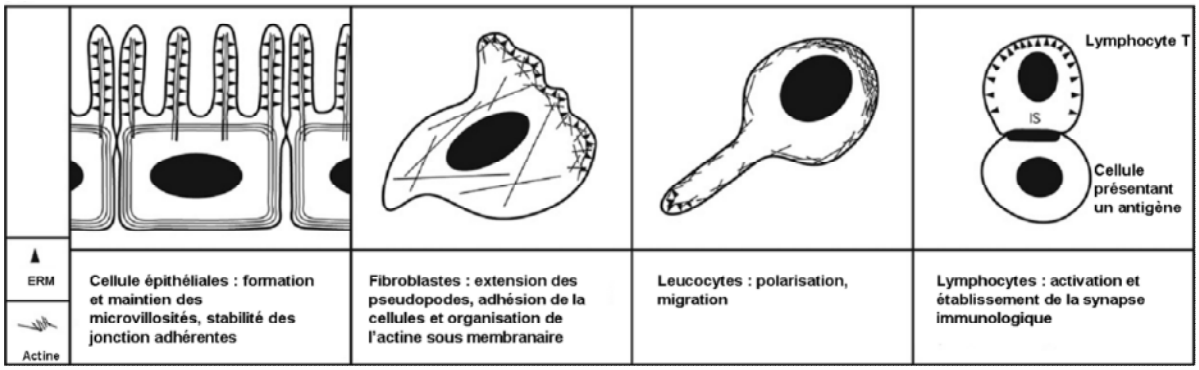



Fig A.I.17. Localisation et rôle des protéines ERM dans différents types cellulaires. Adapté de ( **Niggli et al. 2008**).

Dans les cellules épithéliales, les ERM sont responsables du maintien de la polarité de la cellule et de la formation des bordures en brosses (**Berryman et al. 1993; Bretscher et al. 1997**). Les ERM sont également importantes lors de l'adhésion et de la migration : une des premières protéines identifiées comme interagissant avec les ERM est le CD44 (**Legg et al. 2002; Mori et al. 2008**). Le CD44 est une molécule d'adhésion qui interagit avec la matrice extracellulaire d'un coté et avec les ERM de l'autre coté. Récemment, il est apparu des phénomènes dans lesquels les ERM paraissent importantes. Par exemple l'établissement de la synapse immunologique (SI) (**Charrin et al. 2006; Shaffer et al. 2009; Shaw 2001**). Lors de l'activation des lymphocytes T (LymphT), la forme cellulaire change : il y a disparition des villosités et polymérisation d'actine au niveau de l'interface entre le LymphT et une cellule présentant un antigène (CPA). La moesine est absente de la zone de contact entre LympT et CPA, alors que l'ezrine est présente dans cette même zone. En effet, même avec des structures très similaires et des fonctions redondantes, les protéines ERM ne présentent pas exactement les mêmes rôles. Dans ce cas précis, la moesine interagit avec CD43 alors que l'ezrine interagit avec ZAP-70 (**Ilani et al. 2007**). Cette étude pointe pour la première fois une non redondance dans la fonction des ERM.

La merline, contrairement aux autres ERM, est une protéine suppresseur de tumeur. La déficience en merline n'est pas viable, elle est importante pour le développement de l'embryon (**McClatchey et al. 1997**). La mutation du gène codant pour la merline implique le développement de tumeurs *in vivo* (**Gusella et al. 1996**). Cela suggère que les fonctions de la

merline ne sont pas redondantes avec celles des autres ERM. En effet, plusieurs études indiquent que les ERM auraient un rôle dans le développement de tumeurs (**McClatchey 2003**). En particulier, l'ezrine se révèle nécessaire au passage de la tumeur localisée à la tumeur métastatique (**Hunter 2004**). Il est possible que la position centrale des ERM dans la morphogenèse cellulaire, la migration, l'adhésion, la prolifération et dans des voies de signalisation majeures facilite le passage de la transition entre tumeur locale et métastase.

### ***II.A.3.c.3 – Rôle physiologique des ERM : expériences in vivo***

Lors de la découverte de la première des ERM, l'ezrine, en 1983 par Bretscher (**Bretscher 1983**), il apparaissait que cette protéine était présente en très grande quantité dans les formations membranaires telles que les microvillosités intestinales. Néanmoins aucun rôle clair de son implication dans la formation de celle-ci n'apparaissait. Afin d'étudier plus précisément l'implication des ERM dans la morphogenèse cellulaire (ou tissulaire comme la formation d'un épithélium), plusieurs études utilisant des souris mutantes ont émergé.
Une étude de Saotome et collaborateurs (**Saotome et al. 2004**) a démontré, à l'aide de souris mutantes n'exprimant plus l'ezrine, que les cellules de l'épithélium intestinal montrent des malformations : les microvillosités se forment mais leur morphologie est changée. Au lieu d'avoir des microvillosités bien orientées et de taille définie, celles-ci sont plus épaisses, moins longues et très peu orientées (*fig A.I.18*).

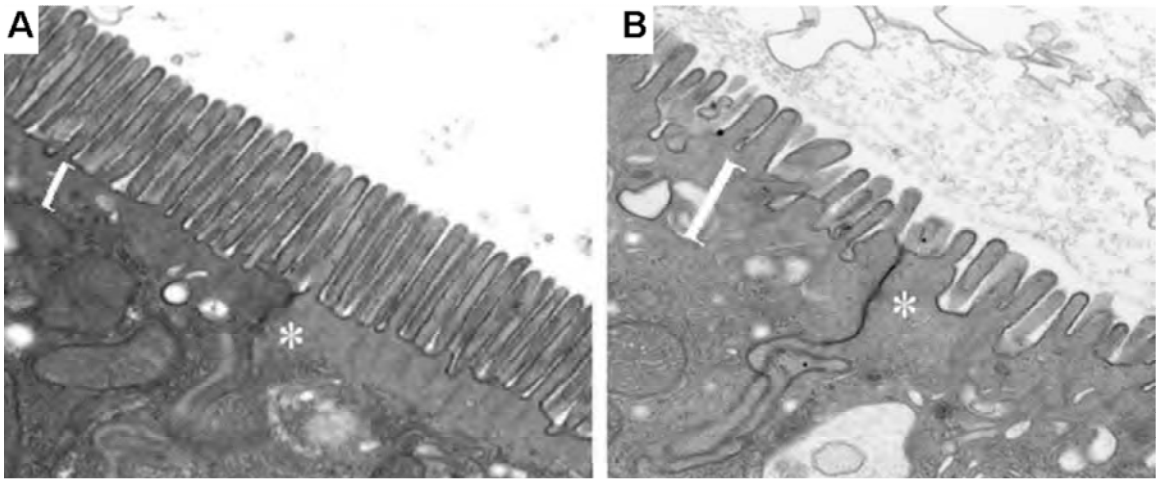



Fig I.A.18. Images de microscopie électronique à transmission (grossissement X11000) de (A) bordure en brosse de souris non mutée et de (B) bordure en brosse de souris déficientes en ezrine. Adapté de (**Saotome et al. 2004**).

En conséquence, les souris mutantes nouvellement nées ne survivent pas plus de quelques jours, leur intestin étant incapable d'incorporer les nutriments essentiels à la survie.

De la même manière, des études de Kitajiri et collaborateurs et de Kikuchi et collaborateurs (**Kikuchi et al. 2002; Kitajiri et al. 2004**) utilisant la même approche que Saotome ont montré que l'absence de radixine n'est pas létale. Néanmoins, les souris sans radixine montrent des lésions du foie après 8 semaines (**Kikuchi et al. 2002**). De plus, la radixine parait importante pour la mise en place de l'architecture des stéréocils cochléaire mais son absence est compensée en partie par les autres ERM, notamment l'ezrine.

La redondance de la fonction des ERM peut être confirmée par une autre étude de Doi et collaborateurs (**Doi et al. 1999**). Les auteurs ont montré que les souris mutantes déficientes en moesine n'ont montré aucune anomalie fonctionnelle ou structurelle des tissus. Leur résultat démontre clairement que la moesine n'est pas nécessaire, ni au développement, ni à la survie chez la souris.

#### ***II.A.3.c.4 – Oligomérisation de l'ezrine observée in cellulo***

Les structures des ERM sont connues et il a déjà été montré qu'il existe des interactions entre domaine FERM et domaine C-terminal. Aussi, il a été émis l'hypothèse que les interactions intramoléculaires gardant l'ezrine sous sa forme fermée, peut permettre à celle-ci d'oligomériser (**Gautreau et al. 2000; Bretscher et al. 1995**). La présence d'oligomères d'ezrine n'a été détecté *in cellulo* qu'une douzaine d'années après sa découverte. Peu d'études pointent la présence de ces oligomères, et aucune ne donne vraiment le rôle précis de ceux-ci au sein de la cellule. Par exemple, dans l'étude de Gautreau et collaborateurs (**Gautreau et al. 2000**), les oligomères sont vus comme des agrégats de protéines inactives. Dans leur vision, les oligomères sont détruits lors de l'activation de l'ezrine à la membrane. *A contrario*, dans l'étude de Berryman et collaborateurs (**Berryman et al. 1995**), les multimères sont vus comme des formes actives de la protéine.
Les deux études précédentes ne sont pas effectuées dans les mêmes tissus, ni dans les mêmes conditions. Néanmoins, à l'heure actuelle, ni le rôle de ces multimères *in vivo*, ni le mécanisme de formation n'ont été clairement identifiés. De même, le fait que ces oligomères soient composés de protéines actives ou inactives reste encore une inconnue.

**Les protéines ERM interagissent avec les phosphoinositides afin de réguler certaines fonctions cellulaires impliquant la membrane et le cytosquelette.**

La partie suivante sera consacrée à introduire le cytosquelette et l'actine. Nous introduirons également les différents phénomènes ayant lieu au niveau de l'actine ainsi que les différents phénomènes identifiés qui peuvent l'influencer.

## II.A.4 – Le cytosquelette et les filaments d'actine.

Au sein d'un organisme les cellules ne sont pas figées. Afin de pouvoir s'organiser les unes avec les autres, les cellules doivent pouvoir maintenir ou faire évoluer certaines de leurs propriétés telles que leur forme, leur position ou leur fonction. Ces ajustements sont assurés par l'intermédiaire de réseaux de polymères biologiques dynamiques que l'on nomme cytosquelette.

### *II.A.4.a – Définition et description du cytosquelette.*

Le cytosquelette est un ensemble protéique rigide organisé, situé à l'intérieur de la cellule. Il est composé de différentes fibres (*fig I.A.19*), qui se différencient par leurs tailles, leurs propriétés mécaniques et leurs fonctions (**Alberts et al. 2008**) :

- Les filaments d'actine sont des filaments flexibles, polarisés, composés d'actine polymérisée. Leur diamètre est de 7 nm. Ils sont présents à forte concentration (150 µM) dans presque toutes les cellules eucaryotes. L'actine est à la base de la motilité cellulaire.
- Les microtubules sont des filaments très rigides du cytosquelette. Ils sont composés de dimères de tubuline et également polarisés. Leur diamètre est d'une vingtaine de nanomètres. Ils participent à la structure et à l'organisation globale de la cellule ainsi qu'au trafic intracellulaire. Les microtubules irradient à partir d'un centre organisateur proche du noyau : le centrosome. Les microtubules s'étendent des centrioles jusqu'à la membrane plasmique. Ce sont les microtubules qui forment le fuseau mitotique lors de la mitose
- Les filaments intermédiaires ont un diamètre qui varie entre 7 et 11 nm, et leur composition en protéines dépend du type de la cellule. En raison de la diversité de leur structure biochimique, les filaments intermédiaires forment des assemblages différents d'un tissu à l'autre. ils sillonnent généralement tout le cytoplasme, mais se regroupent en faisceaux ou bien restent isolés, selon la cellule considérée. Il y a cinq différentes espèces biochimiques de filaments intermédiaires : les kératines épithéliales, les neurofilaments de la plupart des neurones, les filaments de desmine des cellules musculaires, les filaments gliaux des cellules gliales et les filaments de vimentine des cellules d'origine mésenchymateuses.

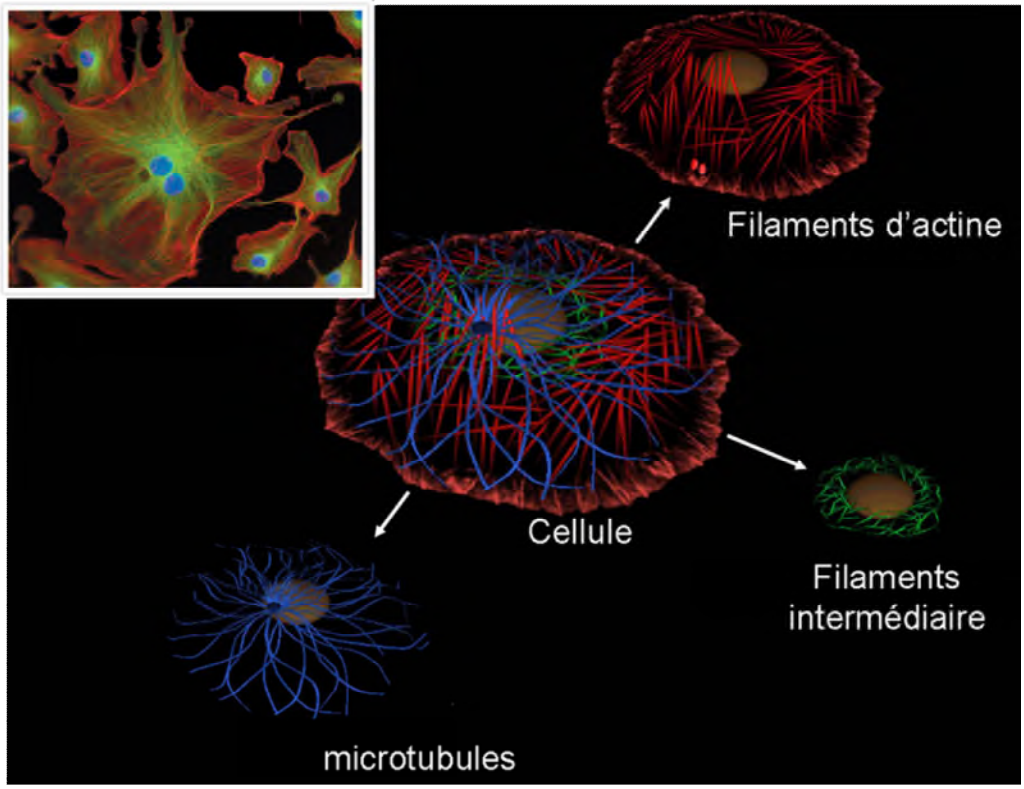



Fig I.A.19. schéma d'une cellule. Les différents filaments du cytosquelette sont représentés à part. L'encart montre une image en microscopie de fluorescence, l'actine est en rouge et les microtubules sont en vert. Adapté du site de l'IMBA.

Les propriétés mécaniques de la cellule dépendent surtout du cytosquelette et du réseau de filaments. Le cytosquelette donne sa forme a sa cellule, néanmoins il est très dynamique et il peut déformer la membrane et ainsi produire des forces : il est à la fois le squelette et la musculature cellulaire.

Nous nous intéressons plus particulièrement aux filaments d'actine. En effet, ce sont eux qui permettent à la cellule d'être motile. Dans de nombreuses cellules animales c'est la protéine la plus abondante, puisqu'elle peut représenter jusqu'à 10 % des protéines totales dans les cellules non musculaires, et jusqu'à 60 % dans les cellules musculaires.

Les cellules eucaryotes sont capables d'organiser les filaments d'actine en différentes structures (*fig I.A.20*). En effet dans les filopodes (extension de la cellule en forme de doigts) et les fibres de stress (fibre à l'intérieur de la cellule), les filaments d'actine forment plutôt des câbles, alors que dans le lamellipode le réseau d'actine sous membranaire est plutôt sous le forme d'un réseau dendritique.

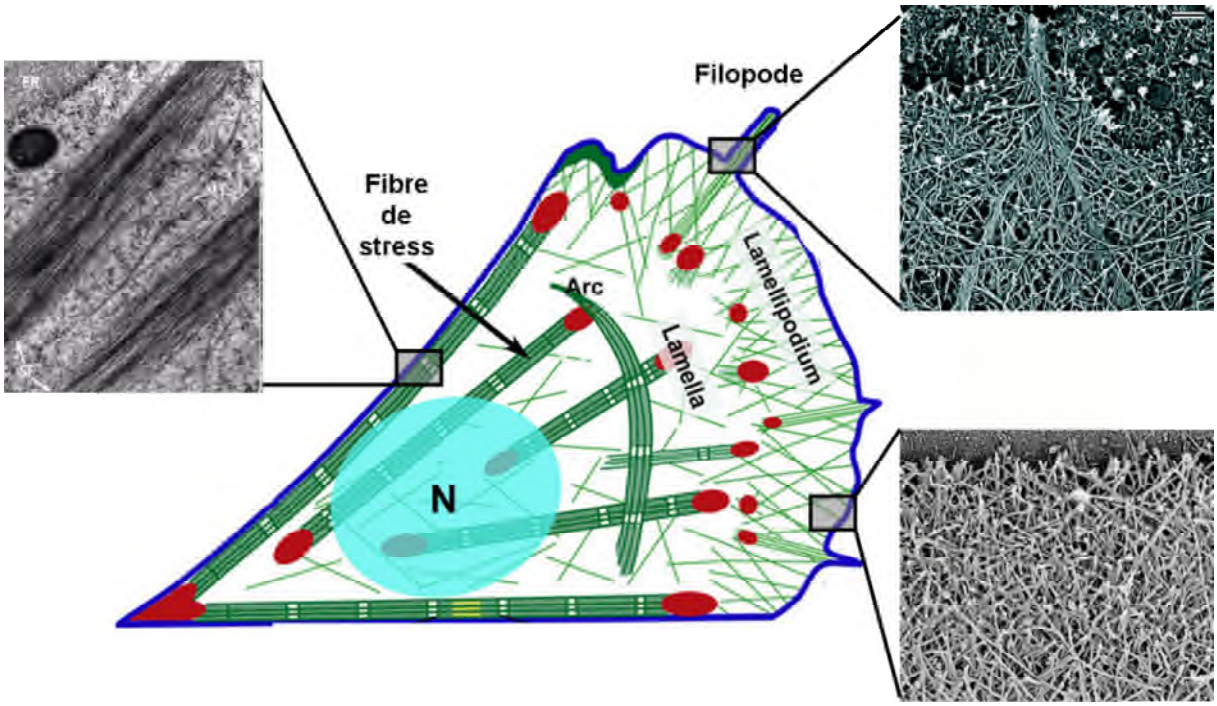



Fig A.I.20. Schéma et images de microscopie électronique des différents types de réseau d'actine dans une cellule. Le noyau est noté N, les points rouge représentent les points d'adhésion. Adapté de Borisy Lab Web Page et de Svitikina et collaborateurs (**Svitkina et al. 2003**).

### ***II.A.4.b – Les filaments d'actine et leur dynamique.***

Les filaments d'actine sont constitués de monomères d'actine qui s'assemblent entre eux pour former un polymère. Le monomère d'actine est une protéine ubiquitaire, le pourcentage d'homologie d'une espèce à l'autre est de l'ordre de 80 %. Il existe plusieurs isoformes de l'actine, l'homme en possède 6 dont les séquences sont identiques à 95 %. La partie variable concerne les 30 acides aminés du coté amino-terminal (sur un total de 375 résidus). Ces isoformes sont spécifiques des tissus comme les cellules musculaires avec des isoformes cardiaque, vasculaire, squelettique (actines $\alpha$), ou de cellules non musculaires (actines $\beta$ et $\gamma$) (**Herman 1993; Dugina et al. 2008; Dugina et al. 2009**).

Le monomère d'actine (appelé également actine-G) est une protéine globulaire d'environ 5.5 nm de diamètre et d'environ 43 kDa de poids moléculaire. L'actine peut fixer avec une forte affinité un cation divalent calcium ou magnésium et un nucléotide ATP ou ADP (*fig I.A.21*) (**Alberts et al. 2008**). Il est admis que dans la cellule, la majorité de l'actine-G est liée à un ATP et à un ion magnésium.

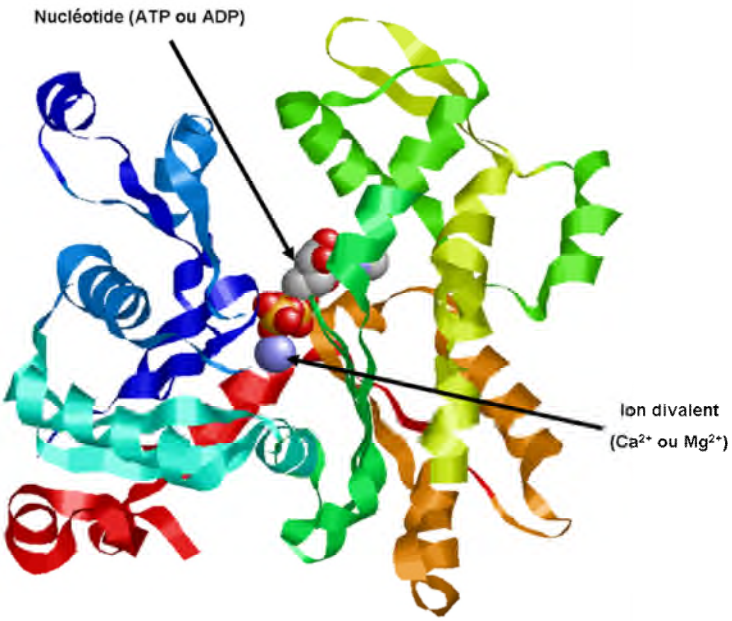



Fig I.A.21. Structure du monomère d'actine. L'emplacement du nucléotide et de l'ion divalent. Les couleurs sont ajoutées pour améliorer la visibilité. Adapté de Otterbein et collaborateurs (**Otterbein et al. 2001**)

Les monomères d'actine (actine-G) s'associent en filaments (actine-F) lorsque des conditions favorables sont réunies, c'est-à-dire, lorsque la solution contient des ions divalents, le nucléotide ATP et que la concentration en actine-G est au dessus de la concentration critique de polymérisation ($C_c$) (**Cooper et al. 1983**).

Les filaments d'actine se présentent sous la forme d'une double hélice d'un diamètre d'environ 7 nm. Le pas de cette hélice est de 71.5 nm et il est constitué de 13 sous unités (*fig I.A.21*). Le filament est polarisé : on distingue l'extrémité pointue (ou extrémité -), de l'extrémité barbée (ou extrémité +). Les taux d'association $k_+$ et des sous-unités au bout barbé sont plus grands que ceux au bout pointu (*fig I.A.21*) (**Pollard 1986**).

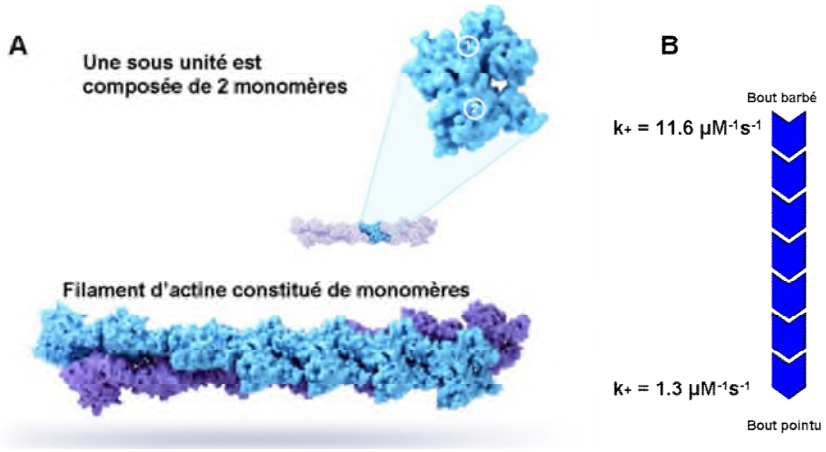



Fig I.A.21. (A) Filament d'actine et des sous-unités qui le composent. (B) Schéma d'un filament d'actine avec le bout + (barbé) et le bout – (pointu). Adapté de U.S National Library of Medecine.

*In vitro*, la polymérisation de l'actine peut se décomposer en trois phases (*fig I.A.22*) :

- La nucléation : les monomères s'associent pour former des oligomères instables. En présence d'un trimère et quand la concentration est supérieure à Cc, la polymérisation commence aux deux bouts du filament. La formation de noyaux est très défavorable, d'où l'existence d'un temps de latence dans la courbe de polymérisation correspondant au temps qu'il faut pour former des noyaux.
- L'élongation des filaments : les monomères d'actine s'ajoutent aux bouts pointu, et barbé. Les paramètres cinétiques d'assemblage et de dissociation des monomères d'actine au bout pointu ne sont pas les mêmes qu'au bout barbé. Ils dépendent du cation divalent et du nucléotide. La figure I.A.23 donne les valeurs des constantes d'association ($k_+$, $\mu M^{-1}.s^{-1}$) et de dissociation ($k_-$, $s^{-1}$) de l'actine-G sur le filament (**Pollard 1986**). L'élongation du filament correspond à la somme des réactions d'association et de dissociation de monomères aux deux extrémités du polymère, et il se poursuit jusqu'à ce que la concentration en actine-G soit égale à la Cc (en effet en dessous de Cc l'actine ne polymérise pas).
- L'état stationnaire : l'actine est dans un état d'équilibre entre les deux formes (actine-G et actine-F). Les deux formes coexistent et leur concentration ne varie plus.

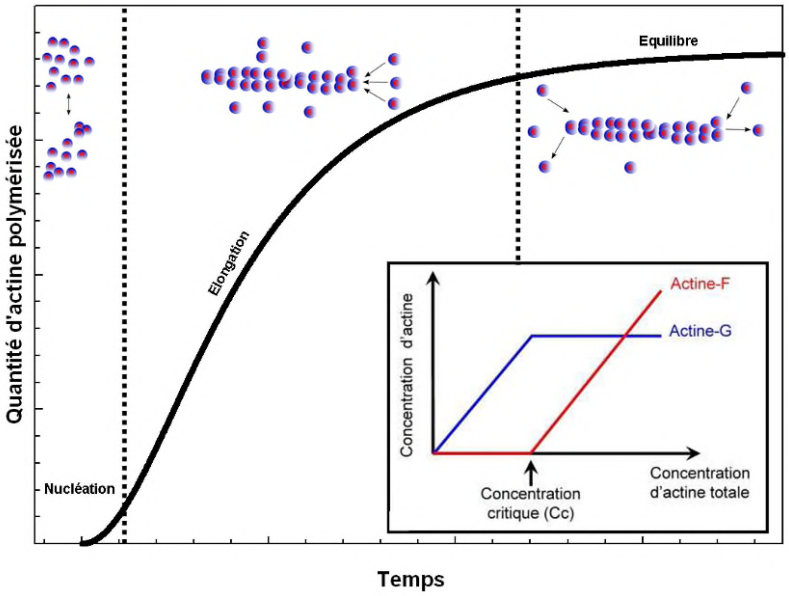



Fig I.A.22. Exemple de cinétique de polymérisation d'actine simulée et représentation des trois phases de polymérisation : la nucléation, l'élongation et l'équilibre. Le graphe en encart représente la relation entre actine-G et actine-F en fonction de la concentration d'actine présente dans le milieu.

A l'équilibre, il existe un phénomène de polymérisation à une extrémité (extrémité barbée) et une dépolymérisation à l'autre extrémité (extrémité pointue). Ce phénomène particulier est appelé le phénomène de « tapis roulant » (ou « treadmilling ») des filaments d'actine. Le treadmilling est dû au fait qu'il existe deux concentrations critiques (une pour chaque extrémité) et au fait que l'ATP s'hydrolyse en ADP dans le filament (*fig I.A.23*).

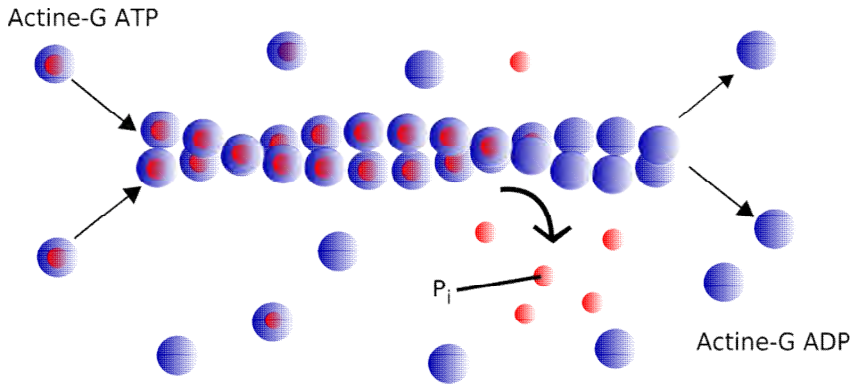



Fig I.A.23. Représentation du phénomène de treadmilling du filament d'actine. Les monomères ATP s'ajoutent au bout barbé, et les monomères ADP dépolymérisent au bout pointu. Les monomères ADP échangent leur nucléotide et redeviennent disponibles pour la polymérisation. Le filament demeure stationnaire en longueur mais subit un renouvellement directionnel de ses unités.

Le phénomène de treadmilling est lent *in vitro*. En effet il est limité par la dissociation au bout pointu ($k_- = 0.26\ s^{-1}$).

***II.A.4.c – Les protéines régulatrices de la dynamique de la polymérisation de l'actine.***

La polymérisation de l'actine seule n'est pas directement adaptée aux besoins cellulaires : la polymérisation est lente, la nucléation est lente, le treadmilling est lent également (cela prend plusieurs minutes). Or les cellules doivent être capables de contrôler et de réorganiser rapidement le cytosquelette d'actine, c'est-à-dire qu'elles doivent être capable de polymériser beaucoup d'actine en l'espace de quelques secondes.

La présence de protéines auxiliaires peut modifier les propriétés dynamiques et/ou structurales du cytosquelette d'actine. Ces protéines sont appelées les ABP (pour « actin binding proteins »). Les ABP sont classées suivant leurs fonctions (non détaillées ici) :

- Les protéines de coiffe ou « capping proteins » et les protéines séquestrantes, empêchent l'addition de monomères et permettent à la cellule de garder de l'actine-G

disponible (CapZ, gelsoline, villine, profiline) (**Pantaloni et al. 1993; Schafer et al. 1995**).

- Les protéines qui fragmentent les filaments ou « severing proteins » (ADF/cofiline) (**Carlier et al. 1997**).
- Les protéines initiatrices de la polymérisation dites proteines nucléatrices (Arp2/3, spire, formines) (**Machesky et al. 1994; Pruyne et al. 2002; Quinlan et al. 2005**)
- Les protéines qui permettent d'obtenir des réseaux d'actine élaborés (tropomyosine, fascine, α-actinine, filamine, fibrine) (**Tseng et al. 2005**).

C'est la synergie entre toutes ces protéines qui permet, *in vivo*, une polymérisation de l'actine rapide, localisée et spatialement organisée (**Pollard et al. 2001**). Ces protéines ont pu être purifiées et étudiées dans des systèmes in *vitro* et biomimétiques (**Bugyi et al. 2008; Roland et al. 2008; Delatour et al. 2008**).

### ***II.A.4.d – Interaction entre ezrine et actine***

L'ezrine, comme nous l'avons vu, est une protéine qui établit un lien direct entre la membrane via le PIP2 et le cytosquelette de F-actine ou indirect via d'autres protéines (CD44, cdc42, etc…). L'ezrine peut elle jouer un possible rôle dans la régulation de la dynamique de l'actine ? En effet, plusieurs études suggèrent que l'ezrine ne serait pas qu'une simple protéine de pontage.

#### ***II.A.4.d.1 – Aspects structuraux***

L'ezrine possède un premier site d'interactions avec l'actine situé dans son domaine C-terminal. Ce sont les 34 derniers acides aminés qui ont été reportés comme étant important pour la liaison à l'actine (**Turunen et al. 1994)** (*fig I.A.24*). Saleh et collaborateurs (**Saleh et al. 2009**) ont étudié plus en détail le domaine C-terminal, et ont pu mettre en évidence, par mutagenèse dirigée, des acides aminés important dans l'interaction entre ezrine et actine. Les acides aminés T576, K577, R579 et I580 sont importants pour la liaison à l'actine, mais le R579 parait également important pour l'interaction entre domaine FERM et domaine C-terminal. En effet, il existerait, à la vue de leurs résultats, une étape supplémentaire dans l'activation de l'ezrine impliquant également une interaction avec l'actine. Il apparaît que les mutants exprimés seraient des formes ouvertes de l'ezrine mais incapables de lier l'actine. Il en résulte des structures anormales observées au niveau de la membrane plasmique ainsi

qu'une inhibition de la motilité cellulaire (**Saleh et al. 2009**). Ceci est en accord avec un article de Kitano et collaborateurs (**Kitano et al. 2006**), qui montre par analyse cristallographique du dimère de radixine que les résidus 295-304 pourraient interagir également avec le C-Terminal et ainsi exercer le rôle d'inhibiteur de l'interaction entre le C-Terminal et d'autres molécules (comme ICAM2).

Un deuxième site putatif d'interaction situé à la fin du domaine FERM (aa 281 – 333) entre l'ezrine et l'actine a également été identifié par Roy et collaborateurs (**Roy et al.1997**) (*fig I.A.24*). Différentes ezrines tronquées ont été utilisées dans des expériences de liaison. L'ezrine est adsorbée sur une surface de polystyrène (solid phase assay), ce processus permettrai d'activer la molécule. Des mesures d'intensité de fluorescence permettent d'observer que lorsque des filaments d'actine fluorescents sont ajoutés sur la surface, ils se fixent sur celle-ci seulement en présence d'ezrine adsorbée.

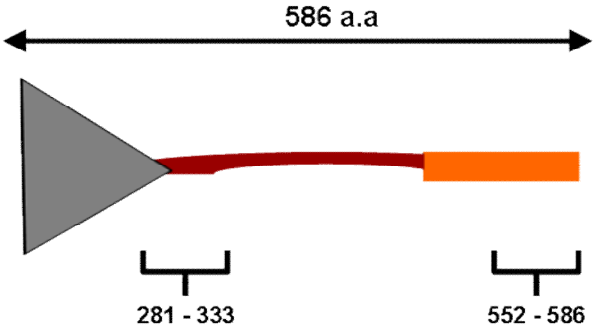



Fig I.A.24. Schéma de l'ezrine. Les deux accolades représentent les sites d'interaction connus avec l'actine.

L'ezrine dans une conformation « active » (ou ouverte), pourrait elle permettre de lier plusieurs monomères d'actine et ainsi former un oligomères d'actine ou faciliter la création de trimères initiateurs de filaments ?

### ***II.A.4.d.2 – Expériences in vitro et in cellulo***

Une étude de Defacque et collaborateurs (**Defacque et al. 2000**) montre que l'ezrine et/ou la moésine facilite le processus de polymérisation de l'actine sur des membranes phagosomales. Un phagosomes est un organite formé de membrane plasmique, il fait suite au phénomène de phagocytose. Defacque et collaborateurs ont réussi à purifier des phagosomes et des billes de latex sont utilisées comme support des membranes phagosomales. *In vitro*, lorsque les billes sont mises en contact d'actine-G et de thymosine-β-4 (qui empêche la polymérisation), elles apparaissent entourées ou liées a de l'actine-F. Le traitement des billes avec de la

chymotrypsine (protéase) abolit complètement ce phénomène, montrant que ce sont des protéines de la membrane phagosomales qui sont importantes. L'assemblage de l'actine-G sur les billes est également grandement diminué lorsqu'ils immuno-marquent à l'aide d'anticorps anti-ezrine et anti-moésine (les anticorps vont empêcher aux protéines d'interagir), montrant que ce sont ces protéines qui sont importantes pour l'assemblage de l'actine autour des billes. Ils ont également étudié la localisation *in cellulo* de l'ezrine par microscopie électronique : l'ezrine est située à la membrane plasmique et à la membrane des phagosomes.

Charras et collaborateurs (**Charras et al. 2006**) ont montré par microscopie de fluorescence que l'ezrine est la première protéine recrutée à la membrane lors du phénomène de bourgeonnement cellulaire (« bleb ») (*fig I.A.25*).

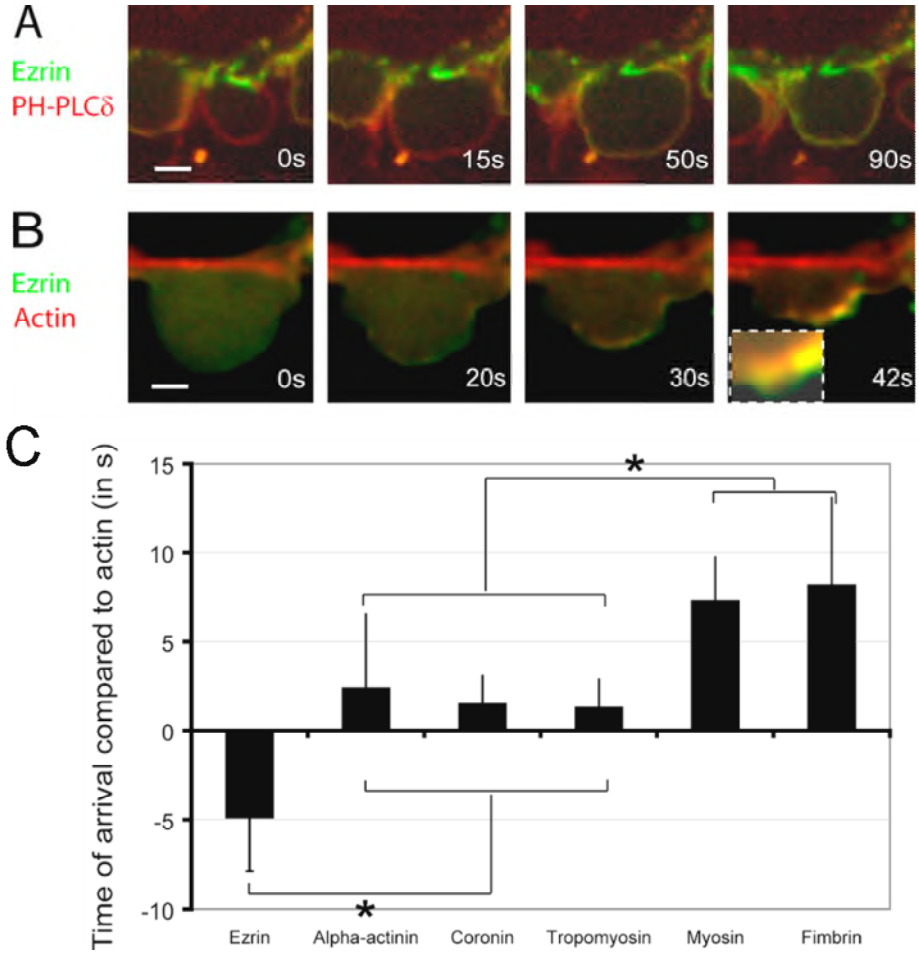



Fig I.A.25. Images de microscopie confocale d'un bourgeonnement membranaire. (A) L'ezrine est en vert et la membrane est en rouge, l'ezrine est recrutée à la membrane dès que l'expansion du « bleb » s'arrête. (B) L'ezrine apparaît à la membrane avant l'actine. (C) Représentation du temps d'arrivée de chaque protéine à la membrane. Le temps zéro correspond à l'arrivée de l'actine. Adapté de Charras et collaborateurs (**Charras et al. 2006**).

Charras et collaborateurs observent qu'en inhibant l'ezrine (avec un inhibiteur de Kinase, la staurosporine ou en injectant du domaine FERM) le cortex d'actine se forme normalement mais ne se rétracte pas. Ils en déduisent que l'ezrine est importante pour la rétraction, l'attachement du cytosquelette à la membrane. Néanmoins ils n'étudient pas directement l'effet de l'ezrine sur l'actine et un possible effet de nucléation ne peut pas être totalement exclu.

Les ABP (actin binding proteins) peuvent interagir avec les phosphoinositides dans la membrane et les proteines ERM semblent des candidates intéressantes en ce qui concerne la nucléation d'actine sur les membranes (**Niggli 1993; Niggli et al. 1995**).

La dernière partie de ma thèse sera consacrée à l'étude de l'interaction entre ezrine et actine dans un système *in vitro* à l'aide de microscopie à ondes évanescentes.

# I.B – *L*es membranes biomimétiques

Les systèmes vivants étant complexes à analyser et modéliser, il est possible de travailler sur des systèmes biomimétiques qui permettent des études *in vitro* dans des conditions expérimentales où les paramètres peuvent être systématiquement variés et contrôlés.

Dans la plupart des expériences classiques de biochimie, il est possible de caractériser directement les interactions entre protéines, et de mesurer l'influence d'une protéine sur le comportement d'autres protéines. Cependant, la caractérisation des interactions directes entre protéines ne suffit souvent pas à comprendre le rôle d'une protéine au sein d'un processus biologique, où de nombreux effets collectifs rentrent en jeu.

C'est pourquoi les systèmes biomimétiques sont un outil de travail pour l'étude et la modélisation de phénomènes dynamiques et permettent l'analyse de phénomènes biologiques complexes et multiparamétriques.

## II.B.1 – Description des différents types de systèmes biomimétiques.

Dans l'eau, les lipides s'associent en micelles, en cylindre ou en bicouches (**Israelachvili 1991**) comme décrit précédemment (Chapitre I.A). Le type d'association formé par les lipides dépend de la structure de ces lipides (densité surfacique de charge de la tête polaire, volume de la tête polaire, volume occupé par les chaines carbonées). L'arrangement le plus stable des phospholipides en milieu aqueux est celui qui minimise l'énergie d'interaction entre la partie hydrophobe et les molécules d'eau. Ce sont les propriétés d'auto-association des lipides qui sont utilisées pour former des systèmes mimant la membrane plasmique : les systèmes biomimétiques.

Il existe plusieurs types de systèmes biomimétiques (*fig I.B.1(A)*) : les vésicules multilamellaires (MLV pour Multilamellar Vesicles) contiennent plusieurs bicouches, fermées et concentriques et les vésicules unilamellaires qui sont constituées d'une seule bicouche. Il existe également un système qui utilise une bicouche de phospholipide. La bicouche est formée sur un support où elle forme une bicouche plane supportée (SLB pour Supported Lipid Bilayer) (*fig I.B.1(B)*).

La méthode la plus simple pour former des MLV consiste à déshydrater des lipides puis à les remettre en suspension en phase aqueuse (ionique ou non) (**Bangham 1965**). Dans ces conditions les lipides vont spontanément former des vésicules, une agitation est souvent nécessaire pour améliorer les résultats.

Quant aux vésicules unilamellaires, elles sont classées en trois domaines de taille :

- Les SUV (Small Unilamellar Vesicles) font de 20 nm à 50 nm de diamètre. Les SUV s'obtiennent par sonication d'une suspension de MLV ou par filtration à travers un filtre de très petite taille. Elles peuvent être produites dans un milieu salin, et notamment physiologique.
- Les LUV (Large Unilamellar Vesicles) ont une taille de 100 nm à 500 nm de diamètre. Les LUV s'obtiennent en faisant passer une solution de MLV au travers des filtres ayant des pores de tailles calibrées (100 nm, 200 nm). Les LUV peuvent être préparées dans une solution physiologique.
- Les GUV (Giant Unilamellar Vesicles) ont une taille variant de 1 µm à plus de 100 µm de diamètre. Les GUV sont formées en milieu non ionique par électroformation (**Angelova et al. 1986**) ou par hydratation douce en milieu ionique. La méthode consiste à réhydrater des lipides en présence ou en absence d'un champ électrique. L'électroformation donne un très bon rendement en vésicules unilamellaires (80 %) alors que l'hydratation douce ne donne qu'un pauvre rendement en vésicules unilamellaires. Néanmoins, avec la méthode d'électroformation les GUV ne peuvent pas être formées en milieu physiologique contrairement aux GUV formées par hydratation douce (**Rodriguez et al. 2005**). Les GUV peuvent également être formées par double émulsion : une goutte de solution aqueuse passe successivement par deux interfaces entre une huile contenant le lipide et une solution aqueuse. De cette manière, une monocouche de lipides est crée à chaque passage de l'interface formant ainsi une GUV (**Stachowiak et al. 2008; Pautot et al. 2003**).

Pour former des bicouches supportées, généralement des LUV ou des SUV sont formées, puis les vésicules sont explosées sur un support avec l'ajout d'ions ou l'ajout d'un tensioactif.
D'un point de vue général, les petites vésicules (LUV, SUV) et les vésicules multilamellaires (MLV) peuvent être produites à des concentrations élevées de l'ordre d'une dizaine de mg/mL (concentration en lipide total) et sont très résistantes. Elles ne nécessitent pas de précaution particulière en ce qui concerne les pipetages, les centrifugations… Leur taille étant bien

calibrée, elles peuvent être employées pour des études quantitatives communément employées en biochimie (par spectrométrie, électrophorèse…). En raison de leur taille, elles ne sont pas observables en microscopie optique.

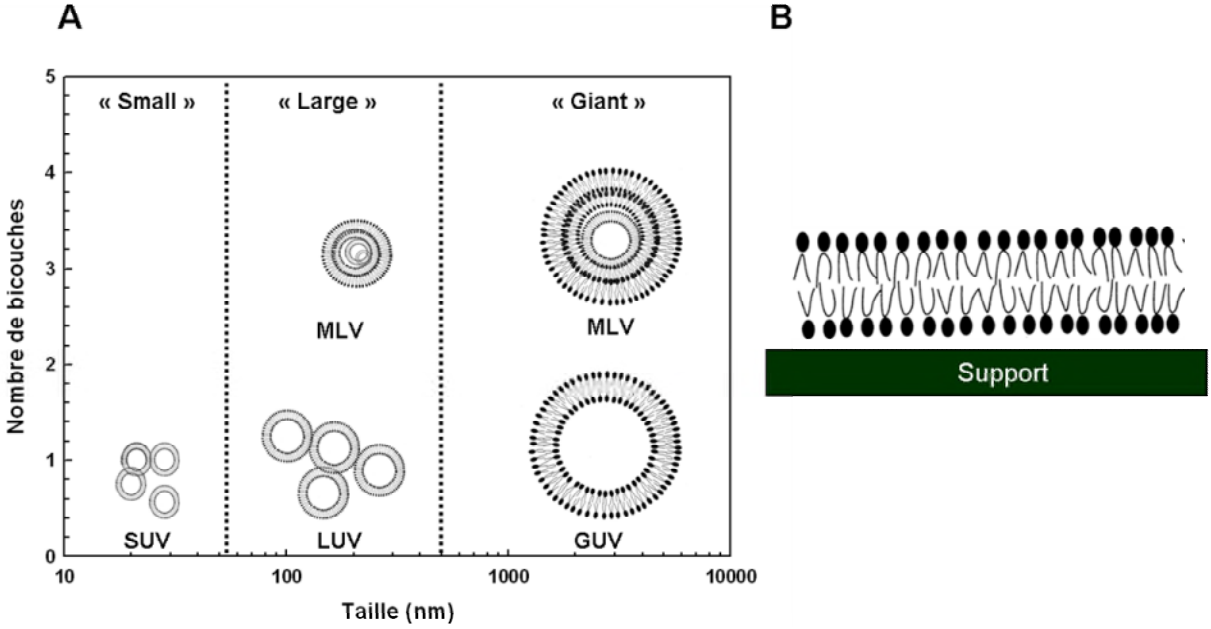



Fig I.B.1. (A) Graphe représentant le type de vésicules en fonction de leur taille et du nombre de bicouches. (B) Schéma représentant une bicouche supportée (SLB).

Les GUV ne peuvent pas se prêter aussi facilement à ce type d'expériences en raison de leur fragilité et de leur polydispersité. Le simple fait de les pipeter peut les détruire. De plus, les concentrations lipidiques maximales obtenues lors de l'électroformation sont de quelques dizaines de µg/ml. Aussi, elles sont formées dans un milieu très peu salin (quelques mM), ce qui ne permet pas des études directes dans leur tampon de gonflement. En effet, les protéines nécessitent un tampon qui va convenir à leur activité, généralement c'est un milieu ionique contenant des ions. Dans la plupart des expériences utilisant des GUV, les GUV sont diluées dans une solution ionique. Aussi il convient de mesurer l'osmolarité de chaque solution et d'en ajuster la composition afin de ne pas induire un choc osmotique des GUV. En revanche, contrairement aux petites vésicules (SUV et LUV), les GUV sont observables en microscopie optique. De façon générale, elles sont plus utilisées pour étudier l'effet d'une protéine sur les propriétés d'une membrane à l'échelle mésoscopique. Par exemple, elles sont employées pour visualiser des déformations membranaires, la formation de radeaux lipidiques, des séparations de phase…).

## II.B.2 – Organisation du PIP2 dans des membranes modèles et sensibilité aux ions.

L'organisation du PIP2 au sein de la membrane plasmique fait débat. En effet, serait-il possible que le phosphoinositide partitionne dans les membranes créant ainsi des « rafts » de PIP2 favorables aux interactions spécifiques entre protéine et membrane plasmique ? Dans cette partie je vais montrer, de manière non exhaustive, quelques études qui ont été réalisées sur des vésicules contenant du PIP2.

### *II.B.2.a – Formation de domaine de PIP2 dans les membranes modèles ?*

Il a été proposé dans la littérature la possibilité pour les phosphoinositides de former des domaines dans les membranes, *via* des ponts hydrogènes qui dans certaines conditions de pH pourraient contrebalancer la répulsion électrostatique des têtes polaires (**Levental et al. 2008; Redfern et al. 2005**). Fernandes et collaborateurs (**Fernandes et al. 2006**) ont montré par fluorescence que le PIP2 à faible concentration (inférieur à 5 % en molaire) ne partionne pas spontanément dans des membranes de POPC dans une gamme de pH allant de 4.8 à 8.4. Cette étude met en défaut deux études de Redfern et collaborateurs (**Redfern et al. 2005**) et Levental et collaborateurs (**Levental et al. 2008)** qui avaient tout deux montré que les phosphoinositides polyphosphates peuvent s'organiser en domaines dans une membrane fluide de phosphatidylcholine en fonction du pH. Néanmoins, l'étude de Fernandes (**Fernandes et al. 2006**) est faite à basse concentration de PIP2 (5% en molaire) alors que les deux études suivantes sont faites à plus hautes concentration (15 % en molaire pour Redfern et collaborateurs (**Redfern et al. 2005**) et des monocouches contenant de 8 % à 50 % de PIP2 pour Levental et collaborateurs (**Levental et al. 2008**). Le partitionnement du PIP2 n'est observé que dans des conditions de hautes concentrations en PIP2. Cela suggère que dans des conditions physiologiques (basses concentrations et pH de 7.4) les interactions attractives entre molécules (ponts hydrogène) ne contrebalancent pas les interactions répulsives, et, donc que le PIP2 ne formerait pas de domaines. De la même manière, sur les GUV, aucun domaine de PIP2 n'a pu être observé sans la présence d'un liguant du PIP2. Gokhale et collaborateurs (**Gokhale et al. 2005**) voient une répartition homogène du PIP2 dans des GUV, et de la même manière, d'autres études constatent le même phénomène (**Krishnan et al. 2009; Moens et al. 2007; Tong et al. 2008**).

### *II.B.2.b – Interaction du PIP2 avec les ions divalents*

Même si le PIP2 n'est pas dans des conditions propices à la formation de domaines, il peut tout de même s'agréger sous l'action d'ions divalents. Il est connu que le PIP2 interagit avec les ions calcium et les ions magnésium. Dès 1988, Toner et collaborateurs (**Toner et al. 1988**) ont montré à l'aide de vésicules multilamellaires contenant du PIP2 que les constantes d'association entre le PIP2 et les ions calcium et magnésium sont respectivement de 500 $M^{-1}$ et 100 $M^{-1}$ dans un milieu contenant 100 mM KCl. L'effet de l'interaction entre ces ions divalents et le PIP2 pourrait être une réorganisation du lipide au sein de la membrane. En effet, en présence d'ions divalents il y a l'apparition de domaines riches en PIP2.
La formation de domaines de PIP2 sur des bicouches supportées due aux ions divalents a récemment été décrite par Levental et collaborateurs (**Levental et al. 2009**).

## II.B.3 – Etudes des interactions entre protéines et PIP2 à l'aide de MLV et LUV.

Les petites vésicules sont des outils de choix pour l'étude des interactions entre lipides et protéines. En effet, elles peuvent être utilisées dans des gammes de concentration très larges et dans beaucoup de techniques biochimiques et physiques. Je présenterai quelques exemples d'études ayant utilisé ces vésicules afin de quantifier l'interaction entre le PIP2 et des protéines.

Les expériences utilisant des vésicules biomimétiques peuvent également permettre de mesurer et de caractériser les interactions du PIP2 avec des protéines spécifiques en déterminant la constante de dissociation $K_d$. Par exemple, Hokanson et collaborateurs (**Hokanson et al. 2006**) ont utilisé des LUV contenant des quantités variables de PIP2, pour montrer à l'aide de cosédimentation et de gel filtration que la myosine-I interagit avec le PIP2 avec une affinité de l'ordre de 230 nM. La même approche a été utilisée pour étudier l'interaction entre le PIP2 et l'annexine 2t (**Gokhale et al. 2005**).
Aussi il a été montré le groupe de McLaughlin, que le PIP2 peut former des rafts dans une membrane lorsqu'il interagit avec le peptide MARCKS ou un peptide penta-lysine (**Wang et al. 2002; Gambhir et al. 2004; Denisov et al. 1998**).

Le tableau I.B présente des exemples d'interaction entre protéines et lipides qui ont été étudiées à l'aide de vésicules biomimétiques contenant du PIP2.

| Protéine étudiée | Vésicules | Expériences réalisées | Bibliographie |
|---|---|---|---|
| Cdc42 et NWASP | MLV | Microscopie | (**Higgs al. 2000**) |
| MARCKS | LUV | Potentiel zêta, cosédimentation, fluorescence | (**Wang et al. 2002**) |
| Syntenine | LUV | Gel filtration, plasmon de surface (SPR) | (**Zimmermann et al. 2002**) |
| Annexine 2t | LUV | SPR, spectrofluorimetrie | (**Gokhale et al. 2005**) |
| Myosine-IC | LUV | Cosédimentation, gel filtration | (**Hokanson et Ostap 2006**) |
| Cdc42 et NWASP | MLV | Spectrofluorimetrie | (**Tomasevic et al. 2007**) |
| GAP43 | LUV | Spectrofluorimetrie, cosédimentation | (**Tong et al. 2008**) |
| Dynamine | LUV | SPR, spectrofluorimetrie | (**Bethoney et al. 2009**) |
| Ezrine | LUV | FCS, spectrofluorimetrie, cosédimentation | (**Blin et al. 2008**) |

Tableau I.B. Liste non exhaustive d'études utilisant des MLV ou des LUV pour quantifier les interactions entre le PIP2 et des protéines.

La dernière étude du tableau (**Blin et al. 2008**) a été réalisée au sein de notre groupe. L'interaction entre le PIP2 et l'ezrine à été étudiée à l'aide de LUV contenant du PIP2. Des expériences de cosédimentation et de spectroscopie de fluorescence corrélée (FCS) ont permis de déterminer l'affinité de l'ezrine pour le PIP2. L'affinité d'une protéine pour un ligand est souvent écrite sous la forme d'une concentration, notée $K_d$, qui représente l'inverse de la constante d'association de la réaction. $K_d$ est appelée constante de dissociation ou constante d'affinité. Pour l'interaction entre l'ezrine et le PIP2, la constante d'association est donnée par

$$K = \frac{[(EzPiP_2)]}{[Ez][PiP_2]} \qquad (1),$$

où $K$ est la constante d'association, [*Ez*] est la concentration en protéine, [*PIP2*] est la concentration de ligand et [(*EzPIP2*)] est la concentration en complexe protéine/ligand. Plus la concentration $K_d$ est petite, et plus l'interaction entre le ligand et la protéine est forte. La constante d'affinité $K_d$ représente la concentration de ligand nécessaire pour lier la moitié de la protéine présente (50 % de liaison). Pour l'ezrine et le PIP2 la constante d'affinité $K_d$ a été mesurée à environ 5 µM (**Blin et al. 2008**). Une expérience de « quenching » de fluorescence a permis de mettre en évidence que, sur ce type de système, l'ezrine n'induit pas le

partitionnement du PIP2. Cette étude a permis par la suite de choisir des conditions expérimentales pour des expériences utilisant des vésicules géantes.

## II.B.4 – Quelques exemples d'études menées sur des GUV et les SLB

Ainsi que nous l'avons déjà mentionné, les GUV se manipulent plus difficilement que les autres types de vésicules mais présentent l'avantage d'être optiquement observables. Elles constituent un système idéal pour étudier des changements de formes de vésicules sous l'effet d'une interaction entre la membrane et une protéine ou pour étudier la répartition des différents constituants qui la composent. Grâce à leur taille, comparable à celle d'une cellule, les GUV peuvent être manipulées à l'aide de micropipettes permettant de mesurer, par exemple, les caractéristiques mécaniques de la membrane (tension, courbure etc…). Je vais donner quelques exemples de travaux utilisant des GUV puis quelques exemples de travaux utilisant des GUV et des membranes planes contenant du PIP2.

### *II.B.4.a – Exemples d'études menées sur des GUV ne contenant pas de PIP2*

Plusieurs études utilisent des GUV afin de voir les effets macroscopiques de l'interaction d'une protéine sur la membrane de celles-ci. Par exemple, Solon et collaborateurs ont ainsi montré par microscopie confocale qu'une protéine de matrice virale M est capable d'imposer une déformation à une membrane et ainsi participer à l'entrée du virus dans un organisme hôte (*fig I.B.3*) (**Solon et al. 2005**).

De la même manière que précédemment, Römer et collaborateurs (**Römer et al. 2007**) montre qu'une toxine bactérienne (la toxine Shiga) est capable d'induire la formation de tubes de membrane.

Des systèmes plus complexes ont également été plus récemment mis au point. Par exemple, des études visent à mimer l'effet du cytosquelette sur une membrane en construisant un réseau d'actine à l'intérieur ou à l'extérieur des GUV (**Limozin et al. 2005**). Ceci permet d'étudier la motilité induite par la polymérisation d'actine ou encore les propriétés mécaniques de la GUV en présence du cortex d'actine. C'est ainsi que Delatour et collaborateurs (**Delatour et al. 2008**) montrent, dans un système reconstitué contenant des GUV et des protéines purifiées, que la propulsion de GUV par la polymérisation d'actine peut avoir plusieurs régimes : elle présente un mouvement continu ou saltatoire.

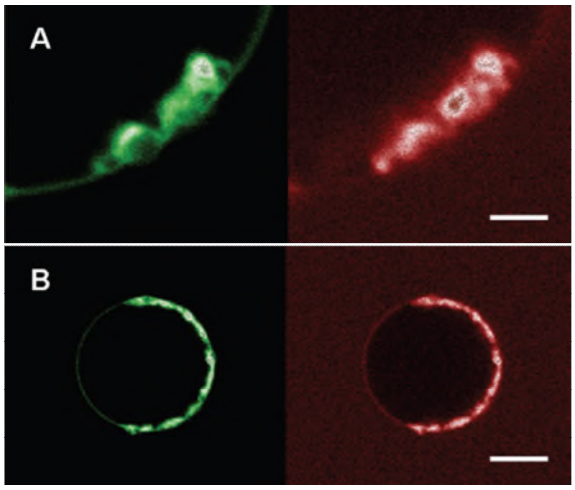



Fig I.B.3. Image de microscopie confocale de GUV en contact avec la protéine de matrice M. Le rouge représente la protéine et le vert représente des lipides négatifs (PS). (A) et (B) La membrane montre des invaginations, qui sont colocalisées avec la protéine. La barre représente 5 µm en (A) et 10 µm en (B).

### ***II.B.4.b – Etudes menées sur des GUV contenant du PIP2***

Comme nous avons pu le voir précédemment, travailler sur des GUV est relativement difficile (fragilité, concentration en lipide etc..). L'ajout de lipides spécifiques dans la membrane des GUV va augmenter la difficulté. En effet, l'ajout de lipides négatif comme le PIP2 va jouer sur la formation des GUV aussi bien que sur la stabilité de celles-ci dans les différentes solutions tampons. Un examen de la littérature permet de mettre en évidence que les études utilisant des GUV contenant du PIP2 ont commencé à émerger très récemment (voir le tableau I.C).

| Etudes | Composition | Solution | Protéines |
|---|---|---|---|
| **Hydratation douce** | | | |
| (**Takeda et al. 2006**) | PC/PE/PG/PIP2 | Tampon KCl (0-120 mM) | Taline |
| (**Tong et al. 2008**) | DOPC/DOPG/SM/Chol/PIP2/ TMR-PIP2 | 100 mM glucose | GAP-43 |
| (**Golebiewska et al. 2006**) | POPC/PS/PIP2 | 100 mM KCl | MARCKS |
| (**Heuvingh et al. 2007**) | DOPC/PIP2 | Extraits cellulaires de HeLa | ARF1, Actine |
| **Electroformation** | | | |
| (**Liu et Fletcher 2006**) | DOPC/DPPC/Chol/TMR-PIP2/PIP2 | 50 mM KCl | N-WASP, Arp2/3, |
| (**Gokhale et al. 2005**) | POPC/POPE/POPS/PIP2 | 160 mM NaCl | Annexine |
| (**Moens et Bagatolli 2007**) | POPC/PIP2/TMR-PIP2 (FL-PIP2, tous les deux en C6) | 200 mM glucose | Profiline |

Tableau I.C. Synthèse des différentes études utilisant des GUV contenant du PIP2 préparées par électroformation ou par hydratation douce. Abréviations : PC (phosphatidylcholine), POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine), PE (phosphatidylethanolamine), POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine), PG (phosphatidylglycerol), DOPG (dipalmitoylphosphatidylglycerol), SM (sphingomyelin), PS (phosphatidylserine), POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylserine), DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine).

### ***II.B.4.c – Etudes menées sur des membranes planes contenant du PIP2***

Il existe également trois études menées avec du PIP2 dans des bicouches supportées (SLB). Le groupe de Steinem. C (**Herrig et al. 2006**) a observé par microscopie de force atomique (AFM) des agrégats d'ezrine sur des bicouches contenant du PIP2. Herrig et collaborateurs montrent que la liaison de l'ezrine est coopérative. Le même groupe a, plus récemment, poursuivi ses travaux sur la compréhension de l'interaction de l'ezrine et des membranes planes en étudiant l'interaction de l'ezrine adsorbée sur la bicouche PIP2 avec de l'actine-F (**Janke et al. 2008**). Les auteurs ont utilisé deux stratégies pour faire interagir l'ezrine sur la membrane (*fig I.B.4*). La première méthode a consisté à utiliser une ezrine sur laquelle une histidine est greffée sur la partie N-Terminale et des lipides-nickel. Ainsi, l'histidine interagi avec les lipides nickel et fixe l'ezrine sur la membrane. La seconde méthode utilise du PIP2 inséré dans la membrane.

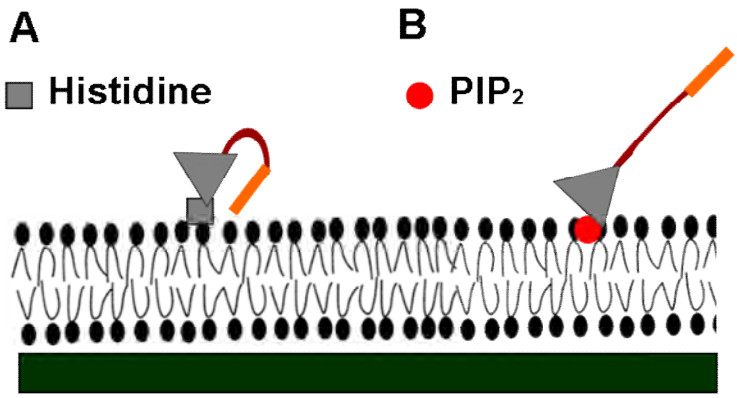



Fig I.B.4. Schéma illustrant les deux méthodes utilisées par le groupe de Claudia Steinem pour faire interagir l'ezrine sur une SLB : (A) à l'aide d'une histidine et de lipides nickel et (B) à l'aide du PIP2.

L'actine-F n'interagit pas avec l'ezrine histidine, indiquant que vraisemblablement elle est dans une configuration où le domaine de liaison à l'actine-F est masqué. L'actine-F n'a interagit qu'avec l'ezrine qui se lie *via* le PIP2. Le mécanisme de dépliement de l'ezrine en contact avec du PIP2 a été étudié à l'aide de l'AFM.

La troisième étude s'intéresse à l'organisation latérale du PIP2 interagissant avec des ions calcium. Levental et collaborateurs (**Levental et al. 2009**) montre que les ions calcium peuvent induire un partitionnement du lipide sur une membrane.

.

**A la vue de la littérature, le système de GUV contenant du PIP2 est utilisé malgré le fait qu'aucune vérification n'a jamais été faite pour mesurer l'incorporation effective du PIP2 au sein de la bicouche.**

Aussi c'est ce que nous proposons de réaliser dans un premier temps. Dans un second temps nous mettrons en contact des GUV avec de l'ezrine afin d'observer l'effet de celle-ci sur la membrane

# I.C – Positionnement du sujet.

Le rôle de l'ezrine *in cellulo*, dans la morphogenèse et la motilité cellulaire a déjà fait l'objet de plusieurs études. L'activation de l'ezrine par la liaison au PIP2 et/ou des phosphorylations a déjà été montrée. Néanmoins, le phénomène reste mal compris et les contributions de chaque événement restent peu claires. De la même manière, les interactions entre ezrine et actine sont difficiles à élucider *in cellulo* : la présence de beaucoup d'ABP peut ne pas faire apparaître clairement le rôle de l'ezrine.

Pour étudier les interactions entre le PIP2, l'ezrine et l'actine nous proposons deux approches :

- Approche *in vitro*, c'est-à-dire utiliser seulement quelques composants *in vitro* afin de déterminer individuellement le rôle de chacun.
- Approche « *bottom-up* », c'est-à-dire que nous proposons de reconstruire un système biomimétique de vésicules géantes contenant du PIP2

Les premières questions que nous nous sommes posés concernent l'interaction entre l'ezrine et le PIP2 :

- Le PIP2 est-il suffisant pour induire une activation de la protéine ?
- Quels sont les effets de la liaison au PIP2 sur l'ezrine ?

L'approche « *bottom-up* » pose également des questions :

- Est-il possible de construire des GUV contenant du PIP2 ? Le PIP2 est-il bien incorporé dans la membrane ?
- L'ezrine est-elle capable d'interagir avec le PIP2 dans la membrane des GUV ?
- L'ezrine est-elle capable d'induire une déformation membranaire ou d'influencer l'organisation latérale des lipides dans la membrane ?

Enfin, dans l'optique de construire un système biomimétique complet d'ancrage du cytosquelette à la membrane *via* l'ezrine et le PIP2, l'étape suivante est d'étudier les interactions entre ezrine et actine :

- L’ezrine est-elle capable de favoriser la polymérisation d’actine ou bien de stabiliser les filaments ? Comment l’ezrine peut-elle réorganiser les filaments à proximité de la membrane ?

Les parties suivantes seront consacrées aux étapes qui viennent d’être énumérées. Je commencerai par présenter les expériences faites pour étudier l’interaction entre ezrine et PIP2, puis j’introduirai notre système biomimétique de vésicules géantes, et je finirai par les interactions que nous avons observées entre ezrine et actine.

# II – Matériels et méthodes

## II.A – Lexique des solutions tampons et produits utilisés

Un lexique des produits biochimiques utilisés est donné ci-dessous, ainsi que la composition des solutions les plus couramment utilisées. Dans la suite du manuscrit, je ferai références à ces produits en employant leur acronyme.

### II.A.1 - Produits

**TRIS : tris (hydroxy) aminomethane (Euromedex).** Le TRIS est utilisé pour tamponner les solutions, c'est-à-dire pour que le pH soit stable lors de l'ajout de molécules.

**Imidazole (Sigma Aldrich)** : l'imidazole est utilisé pour tamponner les solutions, c'est-à-dire pour que le pH soit stable lors de l'ajout de molécules.

**EGTA** : acide ethylèneglycol tétra acétique (Euromedex). L'EGTA est un chélateur des ions calcium. Les ions calcium étant susceptibles de déstabiliser des membranes, l'EGTA est utilisé pour piéger ces ions.

**EDTA** : acide éthylène diamine tétra acétique (Euromedex). ). L'EDTA est utilisé pour chélater les ions magnésium

**DTT** : Dithiothreitol. Il empêche l'oxydation des cystéines dans les protéines. Sa présence permet d'avoir un bon rendement de couplage entre les fluorophores et l'ezrine.

**Sucrose** : le sucrose ultrapure (Euromedex) est utilisé dans la solution de gonflement des vésicules géantes.

**Glucose** : le glucose ultrapure (Euromedex) est utilisé pour visualiser les vésicules géantes car son indice de réfraction optique est différent de celui du sucrose. Il est aussi moins dense que le sucrose et facilitera la sédimentation des vésicules.

**MES** : 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid (Sigma Aldrich). Le MES est utilisé comme tampon de l'ezrine.

**BSA** : Bovine serum albumine (Euromedex). Elle est utilisée pour recouvrir les lamelles d'observation utilisées en microscopie optique afin d'éviter l'adsorption non spécifique d'ezrine sur le verre. Elle est également ajoutée aux mélanges contenant l'actine dans le but d'empêcher les filaments de s'adsorber sur la lamelle.

**Methylcellulose.** La methylcellulose est ajoutée au mélange réactionnel contenant l'actine pour le rendre plus visqueux et ainsi limiter la fluctuation des filaments.

**Antioxydants : catalase, glucose oxydase.** L'ajout de ces enzymes et de glucose dans les solutions va permettre de capter les radicaux libres. Les radicaux libres augmentent le photoblanchiment des fluorophores. Donc en les supprimant, *via* la catalase et la glucose oxydase, le photoblanchiment est limité.

**Adénosine Triphosphate (ATP)**. L'ATP est ajoutée aux solutions lors des expériences avec de l'actine. Son hydrolyse va permettre aux monomères d'actine de polymériser en filaments. D'un point de vue général c'est une molécule utilisée dans les cellules pour fournir de l'énergie aux réactions chimiques.

## II.A.2 - Solutions tampons

Les solutions utilisées sont les solutions qui conviennent pour la formation des GUV et pour la fonctionnalité de l'ezrine. De plus, l'osmolarité des tampons à été mesurée afin d'éviter les possibles chocs osmotiques lors de la dilution de GUV dans un tampon ionique convenable pour l'ezrine.

Tampon de gonflement : il est utilisée pour électro-former les vésicules géantes, elle est composée de 165 mM de sucrose, 0.5 mM EGTA, 2 mM TRIS à pH 7.4. Son osmolarité est de (174 $\pm$ 3) mOsm et elle légèrement inférieure à l'osmolarité du tampon ezrine neutralisé dans le but d'obtenir des GUV légèrement dégonflées lors des expériences de contact avec la protéine.

Tampon glucose : il est constitué de 170 mM glucose, 0.5mM EGTA, 2mM TRIS à pH 7.4. Son osmolarité est de (180 $\pm$ 3) mOsm.

Tampon glucose sans EGTA : il est constitué de 170 mM glucose, 2mM TRIS à pH 7.4. Son osmolarité est de (180 $\pm$ 3) mOsm.

Tampon ezrine : il s'agit du tampon dans lequel l'ezrine est produite et stockée. Il est constitué de 70 mM NaCl, 25 mM MES à pH 6.2. L'osmolarité de ce tampon est de (158 $\pm$ 3) mOsm.

Tampon ezrine neutralisé : il s'agit du tampon précédent qui a été neutralisé par ajout de 3% de TRIS à pH 8. Au final, sa composition est donc de 70mM NaCl, 25 mM MES, 30 mM TRIS, l'ensemble à pH 7.4. L'osmolarité est de (184 $\pm$ 3) mOsm.

Tampon FERM : il s'agit du tampon dans lequel est purifié le domaine FERM. Sa composition est de 20mM TRIS à pH 7.4.

Tampon F 4X : ce tampon est utilisé pour initier la polymérisation de l'actine dans les expériences de fluorescence du pyrène, dans les expériences il est dilué 4 fois. Il est constitué de 10 mM TRIS, 0.6 mM ATP, 2 mM EGTA, 4mM $MgCl_2$, 1.5mM DTT, 136mM KCl. Le tampon est à pH 7.4.

Tampon G : l'actine est stockée sous sa forme globulaire (actine-G non polymérisée) dans ce tampon. Sa composition est 5 mM TRIS, 0.2 mM $CaCl_2$, 0.2 mM ATP, 0.5 mM DTT. Son pH est de 7.4.

- 10X KMEI : lors des expériences de microscopie d'onde évanescente, c'est le tampon qui va initié la polymérisation de l'actine. C'est un tapon ionique composé de 500 mM KCl, 10 mM MgCl2, 10 mM EGTA, 100 mM imidazole. Son pH est de 7.4.

- Tampon de fluo : lors des expériences de microscopie d'onde évanescente, il s'agit de la solution qui contient des antioxydants afin de lutter contre le photoblanchiment des fluorophores. Il est constitué de 15 mM imidazole, 75 mM KCl, 1.5 mM MgCl2, 100mM DTT, 0.03 mg/ml de catalase, 5 mg/ml glucose, 0.3 mg/ml de glucose oxydase et 0.75 % de methylcellulose.

# II.B – Production et purification des protéines

Durant ma thèse, il m'a été nécessaire d'apprendre à produire et à purifier l'ezrine. Les principes de la production et de la purification sont précisés ci-dessous ainsi que les différents types de mutant utilisés.

## II.B.1 – Purification de l'actine

L'actine issue de muscle a été préparée et purifiée au sein de l'équipe de Laurent Blanchoin à Grenoble. Les différents type d'actine fluorescente (actine pyrène et actine rhodamine) ont également été produites à Grenoble.

## II.B.2 - Principe de la production et de la purification de l'ezrine.

L'ezrine est purifiée *via* une méthode dite « recombinante » (**Roy et al. 1997**) mise au point au laboratoire par Christian Roy. Cette technique consiste en plusieurs étapes, identiques pour l'ensemble des protéines produites :

- insertion dans des bactéries Escherichia Coli un plasmide (c'est-à-dire de l'ADN) qui va coder pour la protéine que nous souhaitons produire.
- induction de la production de la protéine dans les bactéries
- lyser les bactéries puis de la protéine d'intérêt, suivi de la coupure du « tag » da la protéine
- purification de la protéine

Le protocole détaillé de la production et de la purification de l'ezrine est donné en annexe.

### II.B.2.a – Insertion du plasmide dans les bactéries

Le vecteur d'ADN bactérien (plasmide) pGEX-2T (*Fig II.B.2*) contient le gène de l'ezrine en fusion à une GlutathioneSTransferase (GST) et à un gène de résistance à un antibiotique, l'ampicilline. Ces gênes ont deux fonctions : d'une part ils permettent de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide et d'autre part ils permettent de purifier l'ezrine par chromatographie d'affinité.

Les bactéries Escherichia Coli de souche TG1 n'insérant pas le plasmide naturellement, il est nécessaire de les rendre « compétentes ». Ceci est réalisé en fragilisant la membrane par choc thermique, afin que le plasmide rentre à l'intérieur des bactéries. Les bactéries sont alors étalées sur une boite de Pétri contenant l'antibiotique contre lequel celles ayant inséré le plasmide sont résistantes. Les boites de Pétri sont laissées à 37°C pendant une nuit. Le matin les cultures sont sorties et mises à 4°C.

Le soir, une colonie de bactéries ayant grandi sur la boite est prélevée et ensemencée dans du milieu de culture à 37°C, sous agitation durant une nuit. A ce stade les bactéries contiennent le plasmide mais elles ne produisent pas encore l'ezrine.

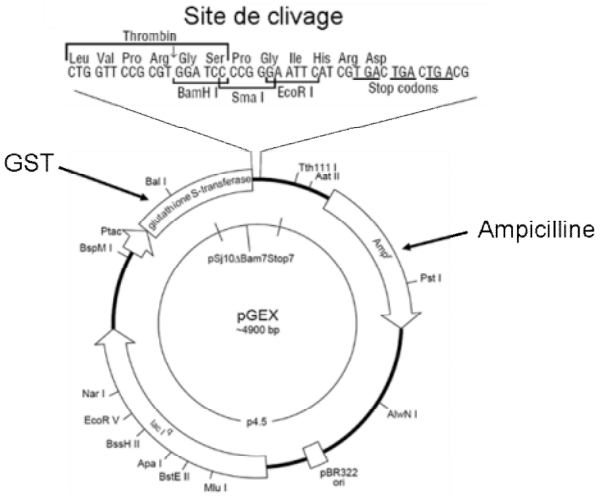



Fig II.B.1. Représentation du plasmide utilisé pour produire les protéines. Le plasmide contient un site codant pour la GST, un site de clivage pour la thrombine et un gène de résistance à un antibiotique (l'ampicilline).

### ***II.B.2.b – Induction de la production et récupération de l'ezrine***

La production de la protéine par la bactérie est initiée par l'addition d'un inducteur : il permet le déblocage de la synthèse en piégeant un répresseur du gène. La bactérie va alors synthétiser la protéine aussi longtemps que dure l'induction. Cette étape ne doit pas durer trop longtemps, environ 1h pour l'ezrine et 30 minutes pour le domaine FERM, pour éviter que la protéine n'aille dans les corps d'inclusion des bactéries. Ceux-ci peuvent en effet être considérés comme une sorte de « poubelle », dans laquelle la protéine est agrégée. Il est alors très difficile de la récupérer fonctionnelle par des voies conventionnelles.

Une fois l'induction finie, les bactéries sont lysées à l'aide d'un sonicateur puis centrifugées. Le surnageant récolté est mis en contact de billes de glutathione agarose : l'ezrine couplée à la GST va interagir avec la glutathione des billes et se fixer sur celles-ci. Les billes sont ensuite lavées afin d'éliminer le lysat, l'ezrine couplée à la GST restant fixée sur les billes.

Afin de décrocher l'ezrine des billes, celles-ci sont mises en contact avec de la glutathionne en solution. L'étape suivant consiste à cliver la GST de l'ezrine. Pour cela l'ezrine GST est incubée 1h30 avec de la thrombine. Il existe un site de clivage à la thrombine entre l'ezrine et la GST.

***II.B.2.c - Purification de l'ezrine sur une colonne FPLC***

Après clivage de la GST par la thrombine, la solution est dialysée afin de la passer dans un tampon contenant 20 mM NaCl et ensuite de l'injecter sur une colonne échangeuse d'anions (Fast Purification Liquid Chromatography). Le principe de la FPLC est de séparer les différents constituants d'un mélange par le passage de la solution sur une résine échangeuse d'ions. Dans le cas présent, une colonne monoQ (GE Heathcare) échangeuse d'anions est utilisée. La protéine est injectée sur la colonne puis un gradient de NaCl entre 20 mM et 1 M est appliqué *(Fig II.B.2)* par mélange de deux solutions mères. Un palier à 4.5 % du gradient (correspondant à 69 mM de NaCl) est appliqué car la protéine est connue pour sortir à ce niveau. La sortie de la protéine est suivie par mesure de son absorbance à 280 nm. Une élution typique de la protéine est montrée *(Fig II.B.2(B et C))*, ainsi que le gel d'électrophorèse correspondant. Nous pouvons voir que la protéine sort de façon très concentrée à un volume fixé, puis que des produits de dégradations sont récupérés dans les fractions suivantes.

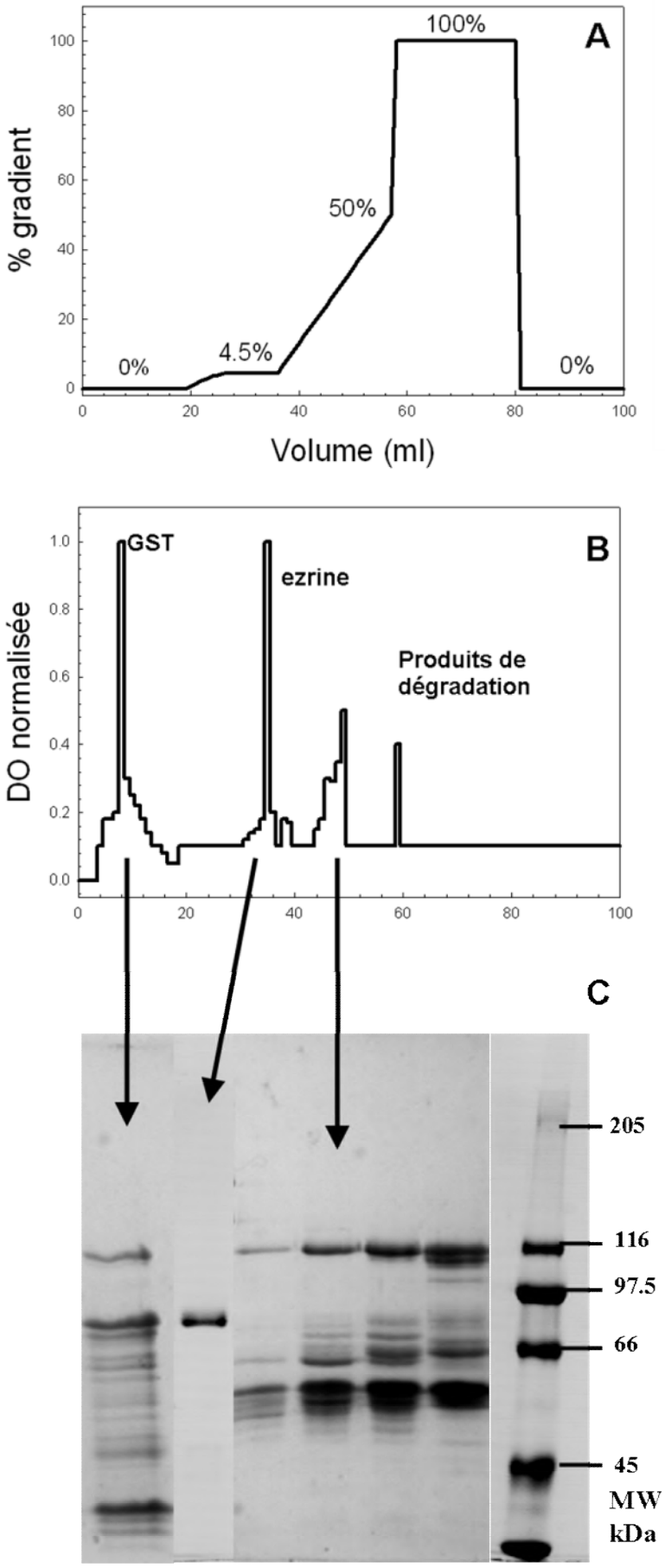



Fig II.B.2. (A) Gradient de concentration en sels passé au travers de la colonne monoQ représenté en fonction du volume injecté dans la colonne, (B) profil d'élution typique de la protéine et (C) montage de gels d'électrophorèse attestant de la pureté de l'ezrine produite. La piste de droite est le marqueur de poids moléculaire et les pistes de gauche sont les fractions sorties de la FPLC. Les fractions déposées sur le gel sont issues de la même purification mais elles viennent de gels différents. En effet il y a beaucoup de fractions qui sortent de la FPLC (environs 70), aussi plusieurs gels sont réalisés.

## II.B.3 – Protéines produites

Le protocole de production et de purification est le même pour toutes les protéines produites. Toutes les protéines purifiées sont représentées schématiquement sur la figure II.B.4.

| Proteines purifiées | Mutations | A.A ajoutés | Schémas |
|---|---|---|---|
| **Ezrine WT** | Aucunes | Aucuns | |
| **Ezrine CYS** | Aucunes | GGC | G-G-C + Alexa546 Ou Alexa 488 |
| **Ezrine 6N** | K62,63,253,254,262,263 Les croix sur le schéma représentent les mutations | Aucuns | |
| **FERM** | Aucunes | Aucuns | |

Fig II.B.4. Tableau schématisant les différentes protéines purifiées, ezrine WT, le domaine N-terminal ou domaine FERM, une ezrine mutante ne liant plus le PIP2, et une ezrine mutante fluorescente. Le vecteur est le même pour toutes ces construction, c'est le vecteur pGEX-2T.

L'ezrine WT est la protéine entière comportant 586 acides aminés sans troncation ni mutation.

Le domaine FERM est constitué des 310 premiers acides aminés sans troncation ni mutation. La purification domaine FERM est plus complexe car il se loge plus facilement dans les corps d'inclusion. La purification ne donne qu'un faible rendement. De plus il n'est pas soluble dans une solution aqueuse au dessus de 1 mg/ml. Pour le domaine FERM : nous ne le purifions pas sur la FPLC, mais nous le clivons avec la thrombine et le récupérons directement sur les billes de glutathione en éluant avec le tampon FERM.

L'ezrine mutante 6N a été mutée sur des paires de lysines en asparagine situées dans le domaine FERM. Il a été montré in vitro que le domaine FERM muté ne lie plus des vésicules

contenant du PIP2 et *in vivo* que le mutant n'est plus localisé dans les microvilli (**Barret et al. 2000**). Les acides aminés mutés sont représentés sur la figure II.B.4 comme des croix dans le domaine FERM.

L'ezrine cystéine ou ezrine CYS est une ezrine récemment mise au point par Christian Roy, qui a réalisé une mutagenèse dirigée pour rajouter deux résidus glycine et un résidu cystéine sur le domaine C-terminal. Ceci permet de greffer de manière covalente un fluorophore sur la protéine car les 3 cystéines présentent dans la protéine ne sont pas accessibles.

Le marquage de l'ezrine CYS se fait à l'aide d'un maleimide couplé à un fluorophore selon une chimie classique couramment utilisée pour les protéines (**Hermanson 1996**). Il existe un grand nombre de possibilité quant au choix du fluorophore. Nous avons choisi un Alexa488-C5-maleimide (Alexa488) ou un Alexa546-C5-maleimide (Alexa546) (Molecular Probes, Eugene, OR) qui sont compatibles avec des longueurs d'ondes standards utilisées en microscopie confocale.

Brievement, le marquage en fluorescence de l'ezrine se fait en ajoutant 10 mM de DTT à la protéine (généralement 1 mL à 7-10 µM) afin de se placer en milieu réducteur. En effet les cystéines peuvent former des ponts disulfures, elles ne sont alors plus aptes à interagir avec le fluorophore. L'ajout de DTT empêche ce phénomène (cystéines libres). Puis, nous ajoutons un excès de fluorophore (50 nM d'Alexa488 ou Alexa546 dilué dans le DMSO) et nous mettons sous agitation pendant au moins 90 minutes. Le fluorophore libre est séparé de la solution de protéine par élution avec du tampon ezrine, sur une colonne Sephadex G25 (GE Healthcare, Velizy, France).

Le taux de greffage est determiné par spectrofluorimetrie en mesurant respectivement l'absorbance de la protéine à 280 nm ($A_{ezrine}$) et celle du fluorophore à 495 nm pour Alexa488 (respectivement 544 nm pour Alexa 546) ($A_{Fluo}$). Connaissant les coefficients d'extinction molaires ($\varepsilon_{fluorophore}$ = 72 000 $M^{-1}cm^{-1}$ pour l'Alexa488 à 495 nm, $\varepsilon_{fluorophore}$ = 104 000$M^{-1}$ $cm^{-1}$ pour l'Alexa546 à 544 nm et $\varepsilon_{ezrine}$ = 69 000 $M^{-1}cm^{-1}$ pour l'ezrine), les rapports de concentrations molaires sont calculés.

Le rendement *r* donne le nombre de moles de fluorophore sur le nombre de moles d'ezrine.

$$r = \frac{A_{Fluorophore} \times \varepsilon_{ezrine}}{\varepsilon_{fluorophore} \times A_{Ezrine}} \quad (2)$$

Dans nos conditions, nous avons eu au minimum 0.7 mole de fluorophore par mole d'ezrine et au maximum 0.93 mole de fluorophore par mole d'ezrine. Les ezrine marquées sont notées ezrine-Alexa546, ezrine-Alexa488 ou ezrine fluorescente.

## II.B.4 – Conservation et stabilité

L'ezrine est récupérée à la sortie de la colonne de chromatographie dans le tampon ezrine. Elle est conservée à 4°C dans ce tampon. Nous suivons par gel d'électrophorèse la pureté de la protéine. La protéine se dégrade et de plus en plus de fragments protéiques sont présent dans la solution au cours du temps : les fragments présent peuvent interagir de manière non spécifique entre eux et avec la protéine entrainant alors une perte d'activité. Lors de test de cosédimentation avec des liposomes contenant du PIP2, nous voyons qu'il y a une perte totale de liaison au PIP2 aussi bien pour l'ezrine WT que pour l'ezrine CYS après 1 mois en moyenne. Nous considérons que l'ezrine 6N est stable durant la même durée même si aucuns tests n'a jamais été fait. Le domaine FERM est conservé à 4°C dans son tampon et il est stable pendant 6 mois.

# II.C – Objets biomimétiques

## II.C.1 –Lipides et conditions de stockage

### *II.C.1.a – les lipides*

Les différents lipides synthétiques et extraits utilisés dans les expériences sont :

●DOPC : 1,2-dioleoly-sn,-glycero-3-phosphatidylcholine. Le DOPC est acheté chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). C'est un lipide synthétique non chargé (zwitterionique). Les deux chaines carbonées sont constituées de 18 carbones et possèdent chacune une insaturation (*fig II.C.1*). Sa masse moléculaire est de 786 g.mol$^{-1}$. Il est conservé sous forme de poudre déshydratée. Avant utilisation le DOPC est dissous dans une solution de chloroforme / méthanol (proportion volumique 2 :1) à 25 mg/ml.

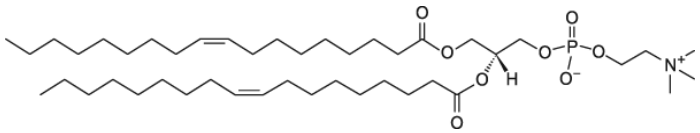


Fig II.C.1. Structure du DOPC

●POPC : 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-glycero-3-Phosphocholine. Le POPC est acheté chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Sa masse molaire est de 760g.mol$^{-1}$. Le POPC est un lipide neutre qui possède deux chaines carbonées de 16 et 18 carbones avec une insaturation sur la chaine la plus longue (*fig II.C.2*). Il est conservé dans de l'eau à 20 mg/ml.

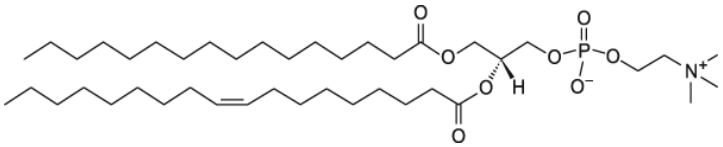


Fig II.C.2. Structure du POPC

●Cholestérol : il est extrait de cerveau de bœuf et pur à 99%. Il est conditionné sous forme de poudre et acheté chez Sigma (France). Sa masse molaire est de 386g.mol$^{-1}$. Avant utilisation il est dissout à 10mg/ml dans une solution de chloroforme / méthanol (proportion volumique 2 :1).

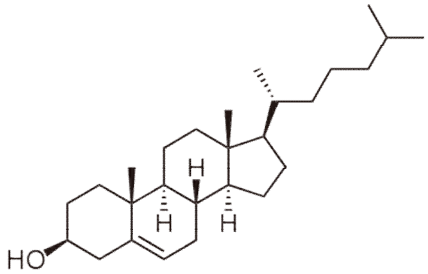


Fig II.C.3. Structure du cholestérol

●PIP2 : L-α-phosphatidyl-inositol-4-5 bi phosphate. Le PIP2 est acheté chez Lipid Products sous la forme de sels d'ammonium (Surrey, Great Britain). Il est extrait de cerveau de bœuf. Il est chargé négativement, sa tête polaire possède trois phosphates. Selon la provenance et le procédé de fabrication la composition lipidique peut changer : les deux chaines aliphatiques peuvent varier dans leurs longueurs et dans la position des insaturations. Un exemple de structure de PIP2 est donné par la figure II.C.4. Sa masse moléculaire moyenne est de 1098 $g.mol^{-1}$. Il est dissout dans l'eau à une concentration de 1mg/ml ou bien dissout dans une solution de chloroforme / méthanol (proportion volumique 2 :1) à une concentration de 1mg/ml.

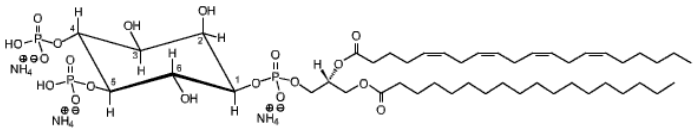


Fig II.C.4. Structure du PIP2

●BODIPY-FL-PI(4,5)P2 chaine courte (C6). Il est acheté chez Echelon Bioscience (Tebu-Bio, France) sous forme de poudre d'ammonium. Ce lipide synthétique analogue au PIP2 est marqué en fluorescence. Il possède une chaine carbonée courte (6 carbones) et une chaine carbonée de 10 carbones sur laquelle est greffé un fluorophore (*fig II.C.5*). Sa masse molaire est de 1282 $g.mol^{-1}$. Il est conservé dans l'eau à une concentration de 0.5 mg/ml.

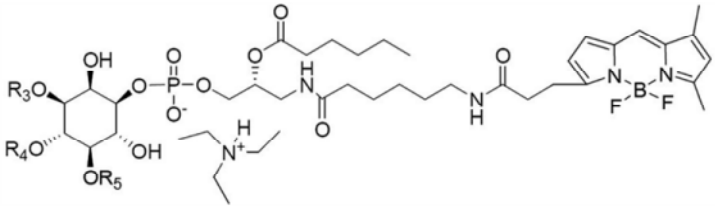


Fig II.C.5. Structure du BODIPY-FL-PI(4,5)$P_2$ à chaine courte (C6), les groupements R sont un hydrogène pour le R3 et deux groupements phosphates pour les R4 et R5.

●BODIPY-FL-PI(4,5)P2 et BODIPY-TMR-PI(4,5)$P_2$ longues chaines (C16). Les PIP2 fluorescents chaines longues sont achetés chez Echelon Bioscience (Tebu-Bio, France) sous forme de poudre d'ammonium. Ils possèdent tous les deux une chaine carbonée de 16 carbones et une chaine carbonée de 10 carbones sur laquelle est greffé un fluorophore (*fig II.C.6*). Le BODIPY-FL-PI(4,5)$P_2$ émet dans le vert (filtre FITC) et sa masse molaire est de 1422g.mol-1. Le BODIPY-TMR -PI(4,5)$P_2$ émet dans le rouge (filtre rhodamine) et sa masse molaire est de 1528 g.mol$^{-1}$.

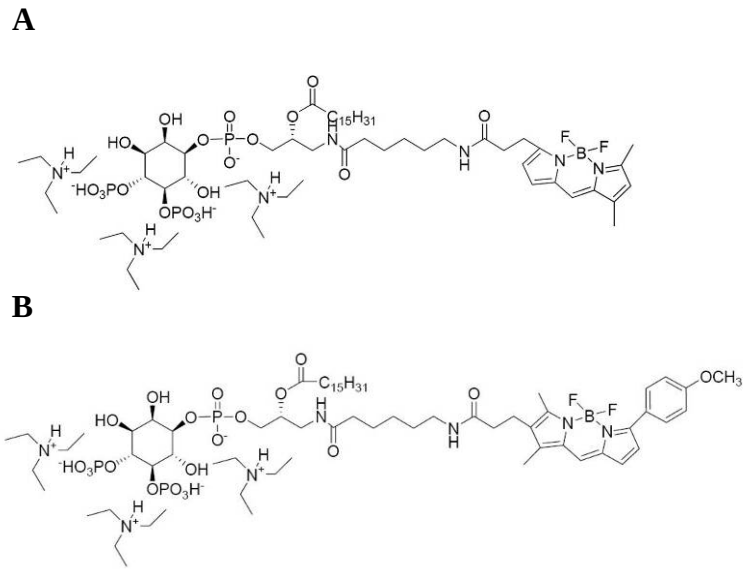



Fig II.C.6. Structure des BODIPY-FL-PI(4,5)$P_2$ (A) et BODIPY-TMR -PI(4,5)$P_2$ (B) à chaines longues (C16)

●IP3 : D-myo-Inositol 1,4,5-trisphosphate (Ins(1,4,5)P3). L'$IP_3$ est un lipide synthétique pur à plus de 95%. Il constitue la tête polaire du PIP2. Il est acheté chez Echelon Bioscience (Tebu-Bio, France) sous forme de sels de sodium. Sa masse molaire est de 551 g.mol$^{-1}$. Il est dissout dans l'eau à une concentration de 1mg/ml.

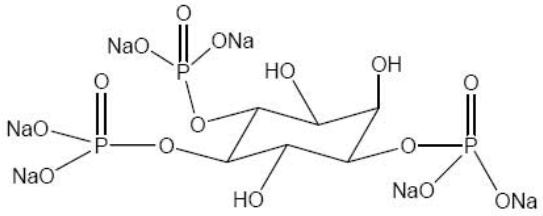


Fig II.C.7. Structure de l'IP3

●POPS : 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serine]. Le POPS est acheté chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Sa tête polaire possède un groupement phosphate, il est chargé négativement. Il possède deux chaines aliphatiques de 16 et 18 carbones. La chaine la plus longue porte une seule instauration (*fig II.C.8*). Sa masse molaire est de 783 g.mol$^{-1}$. Il est dissout dans de l'eau ou dans une solution de chloroforme / méthanol (proportion volumique 2 :1), à une concentration de l'ordre de 10 mg/ml..

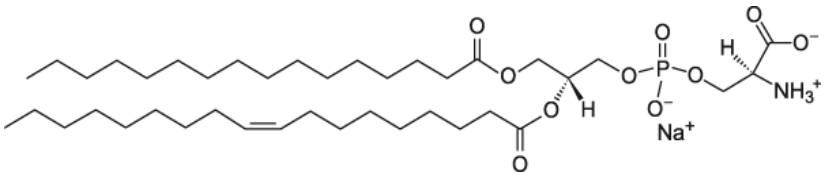



Fig II.C.8.Structure du POPS

***II.C.1.b – Les conditions de stockage***

Les solutions de lipides dilués dans une solution chloroforme / méthanol ne sont pas conservées plus d'un mois à -22°C dans des fioles en verre avec un bouchon en téflon sous gaz inerte (azote). L'oxydation des phospholipides peut conduire à une hydrolyse des têtes polaires et à l'apparition d'acides gras. L'apparition de ces contaminants peut rendre les membranes des vésicules géantes instables et fragiles, ou peut conduire à l'impossibilité de former des vésicules. C'est pourquoi les solutions mères ne sont gardées qu'un mois. En revanche, les lipides conservés dans l'eau peuvent être gardés plusieurs mois à -22°C.

## II.C.2 – Production de vésicules géantes par électroformation

La méthode d'électroformation consiste à déshydrater les lipides sur une surface conductrice, puis à les réhydrater en présence d'un champ électrique alternatif afin de former des vésicules unilamellaires géantes (**Angelova et al. 1986**). La technique d'électroformation ne peut s'utiliser qu'avec des solutions de basses forces ioniques, c'est-à-dire des solutions non physiologiques. Etant donné que les GUV seront toujours étudiées « en système inverse», c'est-à-dire avec les différents constituants d'intérêts placés dans le milieu suspendant, l'osmolarité du tampon de gonflement est ajustée pour être proche de celle du tampon dans lequel nous souhaitons travailler (par exemple le tampon de l'ezrine neutralisé). Dans la suite, le protocole d'électroformation est décrit.

***II.C.2.a - La surface conductrice : les lames ITO***

Une chambre d'électroformation est fabriquée à l'aide de deux lames de verre recouverte d'ITO (Indium Tin Oxyde, NEYCO, Paris) de 5cm x 5cm. L'ITO est déposé en couche mince de 1000Å. La résistivité électrique surfacique des lames ITO est de l'ordre de 60-70Ω□. L'avantage du verre recouvert avec de l'ITO est sa transparence à la lumière visible, aussi l'observation au microscope de la croissante des vésicules au travers des lames est possible. La couche d'ITO a une bonne tenue mécanique ce qui permet de nettoyer efficacement les lames. Une soudure à l'indium d'un fil de cuivre dénudé est réalisée afin d'avoir un contact électrique permanent sur la partie conductrice des lames. De la colle est également utilisée afin de protéger la soudure.

Les lames ITO sont nettoyées à l'eau milliQ, puis à l'éthanol, puis encore à l'eau et séchées sous flux d'azote. Avant utilisation, elles sont frottées avec du chloroforme afin d'éliminer au maximum l'eau pouvant être présente sous forme de fines gouttelettes ou d'une fine couche à la surface du verre. Ensuite les lipides seront déposés sur les lames.

***II.C.2.b - Dépôt des lipides sur les lames ITO et séchage***

Les solutions contenant les différents lipides utilisés sont sorties du congélateur et laissés à température ambiante avant ouverture des flacons afin d'éviter la condensation dans le flacon. Le mode opératoire est le suivant : on prélève à l'aide d'une seringue Hamilton 8 µL de la solution mère de DOPC à 25 mg/ml que l'on dépose dans une fiole en verre. 48µl de chloroforme + 24 µL de méthanol sont ajoutés toujours à l'aide d'une seringue Hamilton 50 µL. Au final nous avons 80 µL de solution à une concentration de 2.5 mg/ml de lipides. Le PIP2 ou le cholestérol sont ajoutés à ce mélange initial de lipide lorsque nous voulons varier la composition des GUV. Lorsque nous incorporons du PIP2 et du cholestérol la procédure est la même, tous les deux étant dans une solution de chloroforme / méthanol (2 :1), le volume de chloroforme et de méthanol à rajouter dans le mélange, pour avoir un volume total de 80 µL à une concentration totale de 2.5 mg/ml de lipide, est ajusté. Le mélange de lipide est homogénéisé pendant quelques secondes à l'aide d'un vortexeur.

20µL de cette solution de lipides sont déposés sur chacune des lames ITO à l'aide d'une seringue Hamilton de 50 µL. La méthode consiste à déposer les 20µL de solution en une seule fois puis d'étaler les 20 µL de solution à l'aide de la seringue *(fig II.C.9)*. Les lames sont

ensuite séchées sous flux d'azote pendant quelques secondes, puis placées pendant au moins 90 minutes sous vide primaire à température ambiante.

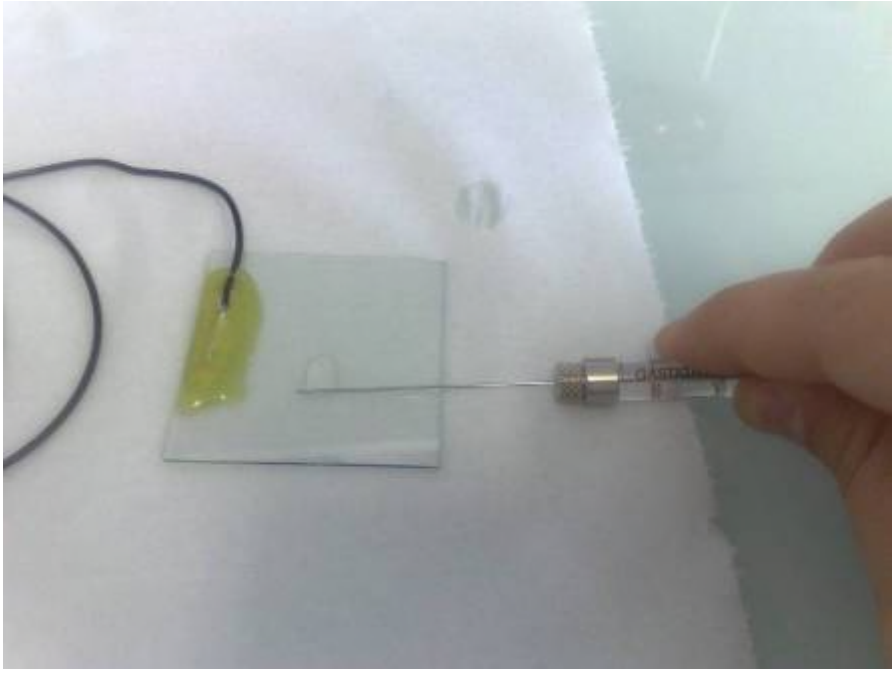


Fig II.C.9. La technique de dépôt de lipides : « l'étalement » de la goutte contenant les lipides.

### ***II.C.2.c - Montage de la chambre d'électroformation***

Les lames ITO sont ensuite assemblées pour former une chambre étanche à l'aide d'un joint torique en caoutchouc perforé et de pâte Vitrex (appelée également pâte de scellement). A l'aide de pâte de scellement (pâte à hématocrite ou pâte Vitrex) nous collons le joint torique sur la première lame. On forme un bourrelet de pâte sur le joint, ensuite avec la seconde lame ITO placée en vis-à-vis de la première on vient appliquer une légère pression sur le bourrelet. En écrasant celui-ci on scelle la chambre hermétiquement. Le volume de la chambre varie entre 1.3 ml et 1.8 ml selon la quantité de pâte de scellement utilisée (*fig II.C.10*).

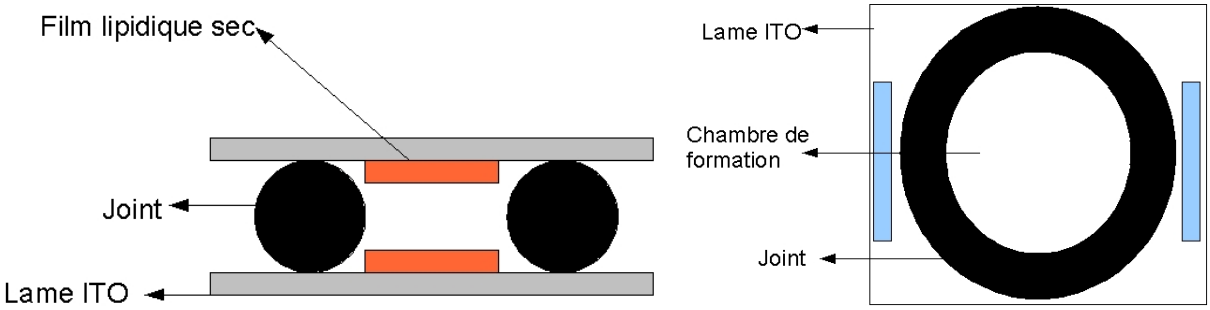



Fig II.C.10. Schéma de la chambre de formation des vésicules géantes

La chambre de formation est alors reliée à un générateur basse fréquence délivrant une tension sinusoïdale de 0.4V et de fréquence 10Hz. La chambre est alors remplie de la solution de gonflement. L'électroformation est effectuée à 37°C car, comme détaillé dans le chapitre suivant, ce sont dans ces conditions que nous insérons le mieux les phosphoinositides fluorescents dans les GUV.

### ***II.C.2.d - Obtention de vésicules géantes unilamellaires (GUV)***

Chaque groupe qui utilise la technique d'électroformation a son propre protocole. La technique est empirique et peut dépendre des lipides utilisés. Nous avons utilisé le protocole suivant pour former des GUV : une fois la solution de gonflement injectée, la tension est augmentée progressivement par paliers de 0.2V. L'observation sous microscope permet de voir quelques minutes après l'application du champ électrique, des centaines de petites vésicules sur la surface. Elles oscillent à la même fréquence que le champ appliqué. Sous l'effet électro-osmotique produit par la tension alternative appliquée, ces petites vésicules fusionnent les unes avec les autres *(fig II.C.12*). C'est à ce moment qu'il faut augmenter la tension pour ne pas casser la dynamique de fusion des vésicules. La tension est augmentée tant que les vésicules fusionnent : lorsque les vésicules se dégonflent au lieu de fusionner, c'est-à-dire autour de 2V, la tension est diminuée *(fig II.C.11)*. La durée totale de l'électroformation est d'environ 1h30 mais cette durée est indicative, ce temps pouvant varier de quelques minutes à plusieurs heures en fonction des lipides utilisés, des solutions utilisées, de la quantité de lipides déposée etc.…

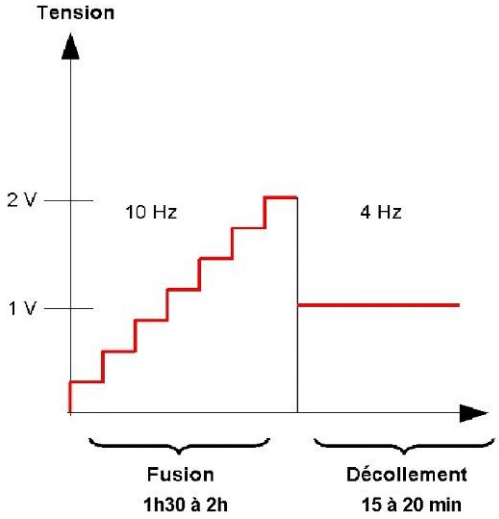



Fig II.C.11. Tension appliquée pendant l'électro-formation en fonction du temps

A ce moment les vésicules sont encore attachées à la surface par un « cou » de lipides. Aussi dans le souci de couper ce lien vésicules / surface le champ est abaissé à une tension de 1V à une fréquence de 4Hz pendant 15 à 20 minutes : c'est la phase de décollement des GUV. La chambre d'électroformation est ensuite ouverte délicatement à l'aide d'un cutter. La solution contenant les vésicules est délicatement prélevée avec une seringue de 1ml (sans aiguille). Le diamètre de l'embout est de plus de 1 mm ce qui évite de cisailler les GUV. La solution est ensuite conservée à température ambiante pendant 24h. La solution est stockée dans un Eppendorf dont l'air contenu dans la partie supérieure a été chassé sous flux d'azote. Les GUV ne sont pas conservées à 4°C car lorsque le mélange de lipide contient du cholestérol, une transition de phase serait observée.

Nous avons mesuré des distributions de tailles de vésicules dans les conditions suivantes : GUV composées de DOPC seulement, GUV composées de DOPC et de 15% de cholestérol en masse et GUV composées de 5% de PIP2 en masse avec et sans 15% de cholestérol. Nous avons également comparé les tailles de vésicules lorsque l'électroformation était faite à température ambiante ou à 37°C. Dans tous les cas, les distributions de tailles n'ont pas montré de grandes différences. Les GUV ont un diamètre entre 1 µm et 150µm pour les plus grandes. Le diamètre moyen se situe autour de 10 µm dans tous les cas. Une répartition de taille typique est montrée sur la figure II.C.13.

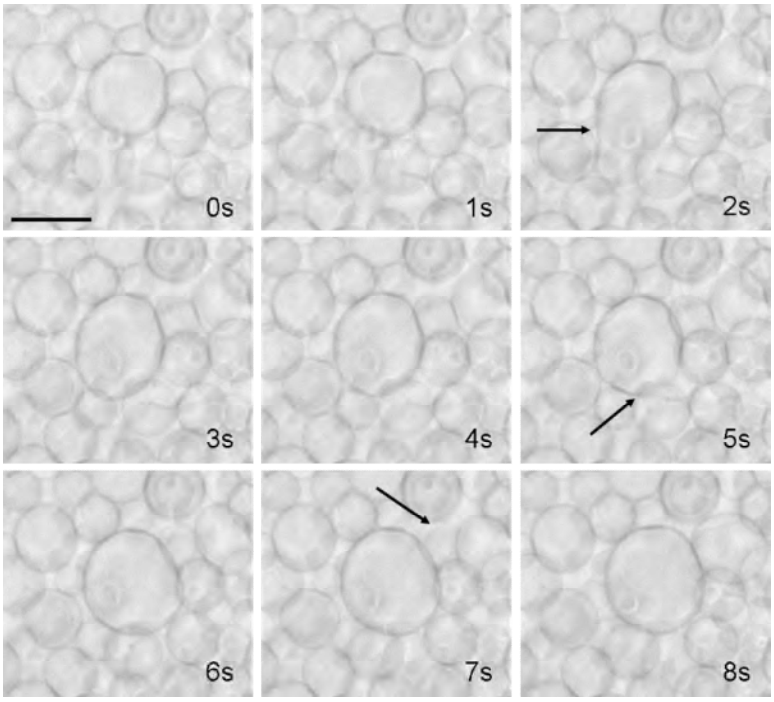



Fig II.C.12. Observation en microscopie de GUV durant l'électroformation. Les flèches montrent les fusions successives (barre d'échelle 10 µm).

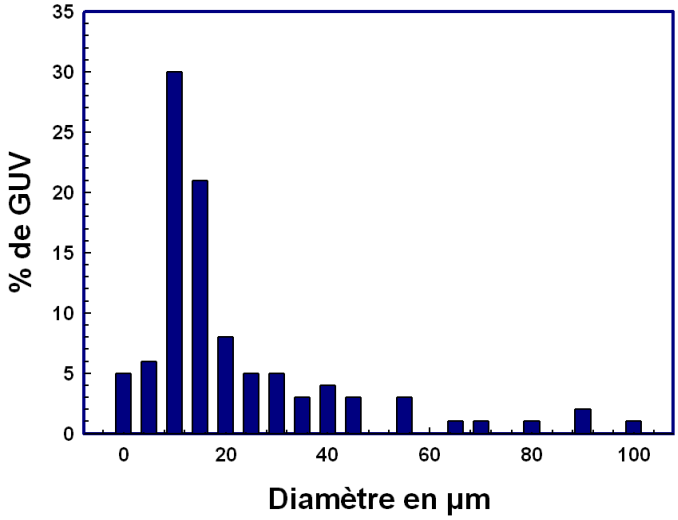



Fig II.C.13. Répartition de taille de GUV réalisée sur 200 GUV environ.

## II.C.3 – Formation de vésicules multilamellaires et de petites vésicules

Les petites vésicules sont formées par extrusion de vésicules multilamellaires (MLV). Ce procédé consiste à les faire passer dans un filtre ayant des pores de taille calibrée dans le but d'obtenir des petites vésicules unilamellaires de 100 nm appelées LUV (Large Unilamellar Vesicles) (**Mayer et al. 1986**).

### *II.C.3.a - La formation de vésicules multilamellaires (MLV)*

Au laboratoire, le protocole de formation de LUV a été mis au point en se basant sur des protocoles publiés (**Golebiewska et al. 2006**). Initialement, le POPC a été utilisé comme lipide principal. C'est pourquoi les petites vésicules que j'ai utilisées dans ce travail sont constituées de POPC et de différentes quantités de PIP2 (**Blin et al. 2008**). Le mélange de lipides est disposé dans un tube à hémolyse et mis à évaporer une nuit à 4°C dans un lyophilisateur. Le lendemain, les lipides déshydratés sont resuspendus dans 500 µL de tampon ezrine neutralisé à la concentration désirée (souvent 5 mg de lipides secs dans 500 µL soit 10 mg/mL), mis dans un bain-marie à 37°C puis vortexés tous les quarts d'heure pendant au moins 10 secondes. Après 1h30 soit 4 à 5 agitations, la solution est trouble ce qui dénote la présence de MLV en solution. Une solution contenant des MLV est montrée sur la figure II.C.4.

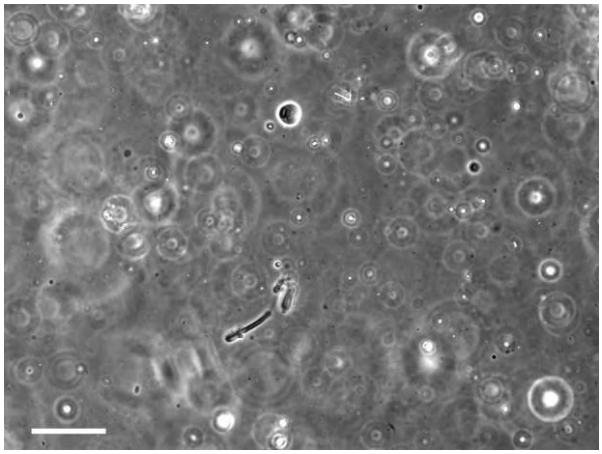


Fig II.C.14. Vésicules multilamellaires observées en contraste de phase. La barre représente 10 µm.

### ***II.C.3.b - Extrusion des MLV***

L'extrusion est réalisée à l'aide du mini extruder de chez Avanti Polar Lipids en utilisant des membranes de polycarbonate de porosité 100 nm. Le montage consiste à introduire dans chaque partie 2 pré-filtres et un filtre de 100 nm, puis à visser l'ensemble. Un support permet de maintenir l'extruder stable pendant le procédé. Deux seringues Hamilton de 250 µL sont disposées de part et d'autre du corps de l'extrudeur, de façon à ce que la solution soit récupérée alternativement dans l'une et l'autre des seringues (figure II.C.15). Avant de faire passer les lipides, de l'eau milliQ filtrée est passée afin de pré-hydrater les filtres et de vérifier qu'il n'y a pas de fuites de liquide.

Fig II.C.15. Mini extruder de chez Avanti, on distingue les deux seringues de part et d'autre du support.

Une fois le montage réalisé et les filtres pré hydratés, nous remplissons la seringue de droite de 250 µL de la solution de MLV, puis on effectue 21 passages (un passage est considéré comme le déplacement de la solution d'une seringue à l'autre). La solution extrudée apparaît beaucoup plus limpide que la solution de MLV (*fig II.C.16*). Les LUV ont une taille moyenne de 100 nm. Une distribution de taille obtenue par diffusion de lumière en utilisant l'appareil

NanoZS (voir méthodes) est montrée sur la figure II.C.17 (**Blin et al. 2008**). La solution peut être conservée durant une semaine à 4°C.

Fig II.C.16. Solution de MLV avant et après extrusion

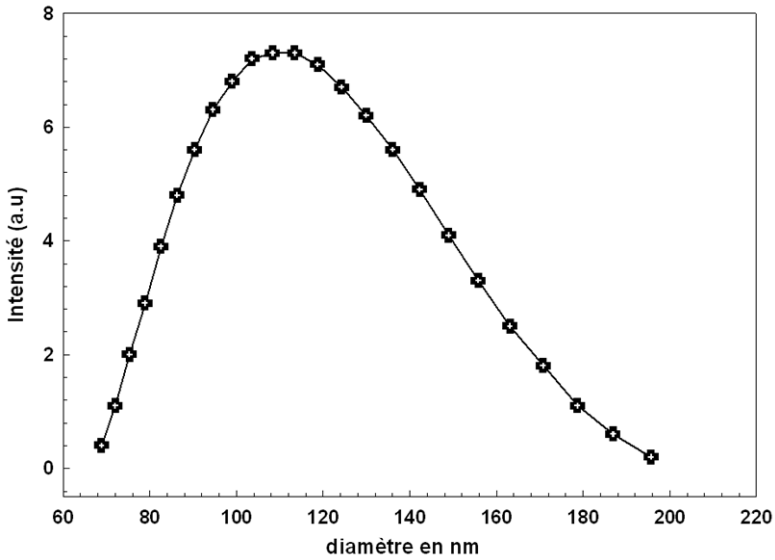



Fig II.C.17. Répartition de taille des LUV formées par extrusion

# II.D – Méthodes d'observation

Les GUV sont de taille micrométrique et nous pouvons utiliser des techniques de microscopie classique afin de les observer. Ici sont présentées les différentes techniques de microscopie utilisées au cours de ma thèse pour observer les vésicules mais également pour observer les filaments d'actine.

## II.D.1 - Microscopie à contraste de phase

Les vésicules comme beaucoup d'objets en biologie, notamment les cellules, sont des objets de phase : ils ne modifient pas l'intensité de la lumière qui les traverse mais ils modifient la phase, leur indice étant différent de celui du milieu qui les entoure. C'est le physicien hollandais F. Zernike qui développa cette technique pour laquelle il reçut le prix Nobel en 1953 (**Zernike 1948**). L'idée est de convertir une différence de phase en différence d'intensité. Le montage se compose d'un diaphragme annulaire situé après le condenseur, et d'une lame quart d'onde (appelé anneau de phase) située après l'objectif du microscope. Le montage est schématisé sur la figure II.D.1.

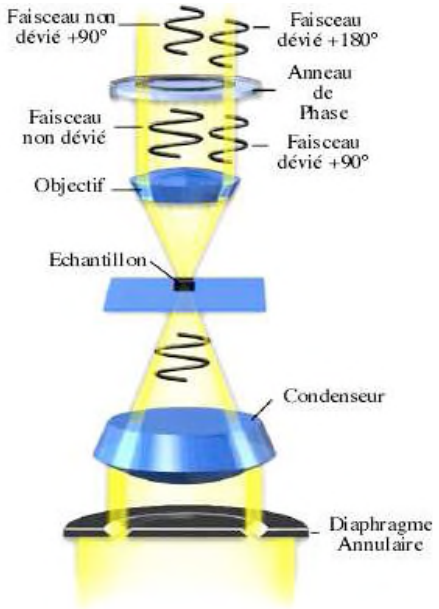



Fig II.D.1. Schéma du microscope à contraste de phase

Un déphasage de + π/2 entre la lumière référence et la lumière qui traverse l'objet, produira un contraste positif (le plus grand indice apparaitra en noir), un déphasage de - π /2 produira un contraste négatif. Dans le cas des vésicules géantes, la solution interne est du sucrose et la solution externe est soit du glucose soit une solution ionique. La GUV apparait en gris/noir car l'indice optique du sucrose est supérieur aux indices de la solution de glucose et de la solution ionique (*fig II.D.2*). Avec cette technique il n'est pas possible de séparer complètement la lumière venant de l'échantillon de la lumière directe de référence. Une partie de la lumière traversant l'objet passe par l'anneau de phase et se retrouve modulée de la même manière. Ceci introduit un artefact optique qui se présente sous la forme d'un halo autour des vésicules (*fig II.D.2*). Ce halo est à l'origine d'une incertitude sur la mesure du diamètre des vésicules de l'ordre de 0.3µm.

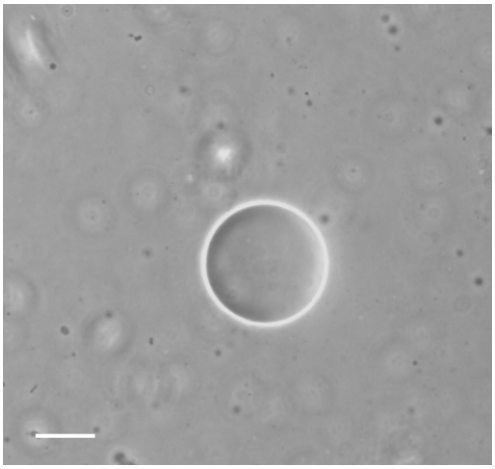


Fig II.D.2. Une vésicule géante contenant du sucrose. Dans une solution de glucose la vésicule apparaît foncée. Le halo est visible sur le pourtour de la vésicule. La barre représente 10 µm.

Durant ma thèse, les expériences de microscopie à contraste de phase ont été effectuées sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 200, objectif X40, ouverture numérique de 1.4.

## II.D.2 - Microscopie de fluorescence

La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un photon, puis à le réémettre à une longueur d'onde plus élevée (*Diagramme de Jablonski, Figure II.D.3*). Soumise à une excitation lumineuse de longueur d'onde donnée, la molécule fluorescente est portée dans un état électronique excité ($S_1$'). A température ambiante, la conversion interne entraîne une perte partielle de l'énergie absorbée et la molécule se retrouve à un état excité moins élevé (S1). Le retour de la molécule à son état stable ($S_o$) est associé à la libération

d'énergie sous forme lumineuse. La perte d'énergie par conversion interne, se traduit par une longueur d'onde d'émission supérieure à la longueur d'onde d'absorption (déplacement de Stokes).

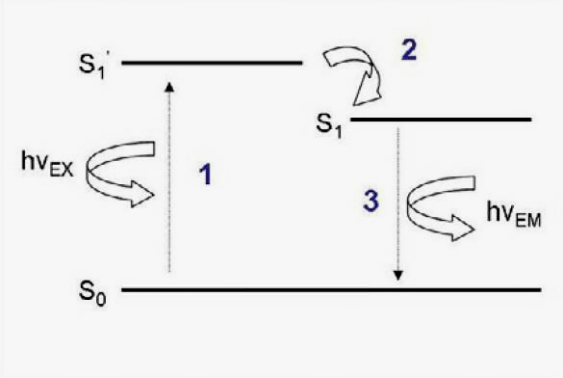



Fig II.D.3. Le fluorophore absorbe un photon et ré-émet un photon à une longueur d'onde différente.

Les longueurs d'onde de la lumière absorbée et réémise sont caractéristiques des différentes molécules. Les fluorophores utilisés pour marqués l'ezrine en fluorescence sont Alexa fluor 488 C5 maleimide et Alexa fluor 546 C5 maleimide (Molecular Probes)(*fig II.D.4*).

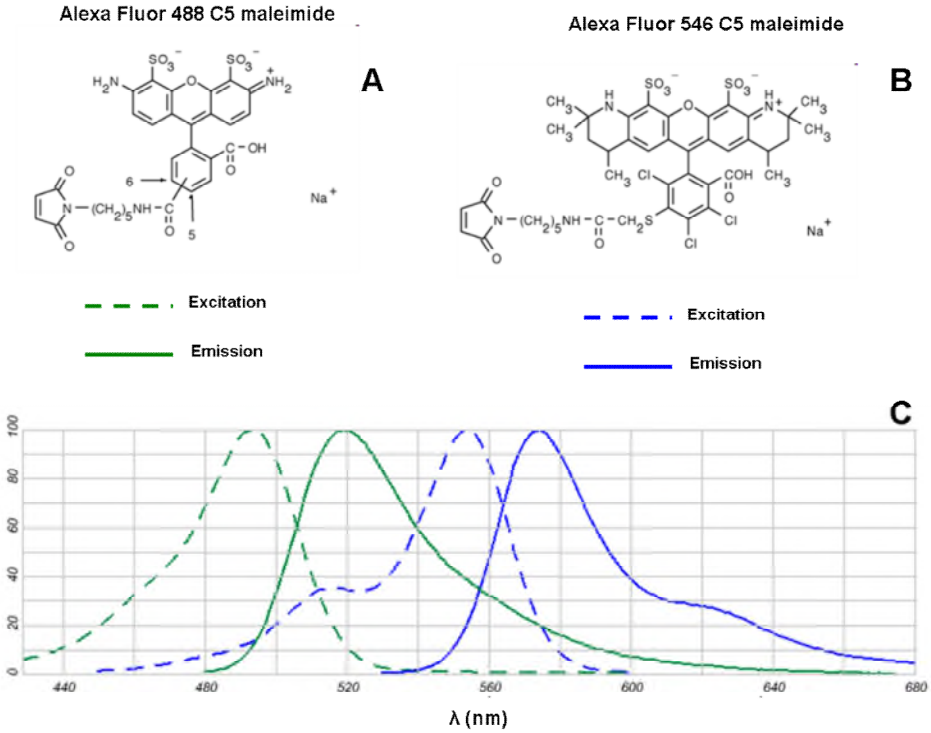



Fig II.D.4. (A) Structure chimique de l'Alexa 488. (B) Structure chimique de l'Alexa 546. (C) Spectres d'absorption et d'émission des deux fluorophores de l'ezrine fluorescente. Adapté de Molecular Probes.

Les fluorophores sont caractérisés également par leur rendement quantique. Le rendement quantique est le rapport du nombre de photons absorbés sur le nombre de photons émis. Le rendement quantique se situe entre 0.2 et 0.8 pour les fluorophores les plus communs (**Valeur 2004**).

Les fluorophores ne sont pas stables sous excitation. Il existe des réactions photochimiques qui détruisent les fluorochromes. Ce phénomène de perte de fluorescence sous excitation est appelé le « blanchiment ».

Ces propriétés typiques des fluorophores vont être mises à profit dans la technique de microscopie de fluorescence. Dans cette technique, une lumière excitatrice est tout d'abord filtrée (filtre d'excitation) puis dirigée par un miroir dichroïque vers l'objectif qui sert d'abord de condensateur au faisceau d'excitation. La lumière ayant atteint l'échantillon est ré-émise par celui-ci, séparée par passage à travers le miroir dichroïque, puis filtrée à travers un filtre d'émission, avant d'être détectée par une caméra.

Durant ma thèse, ces expériences ont été effectuées sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 200, équipé à la fois en contraste de phase et en fluorescence. Le montage est schématisé sur la figure II.D.5.

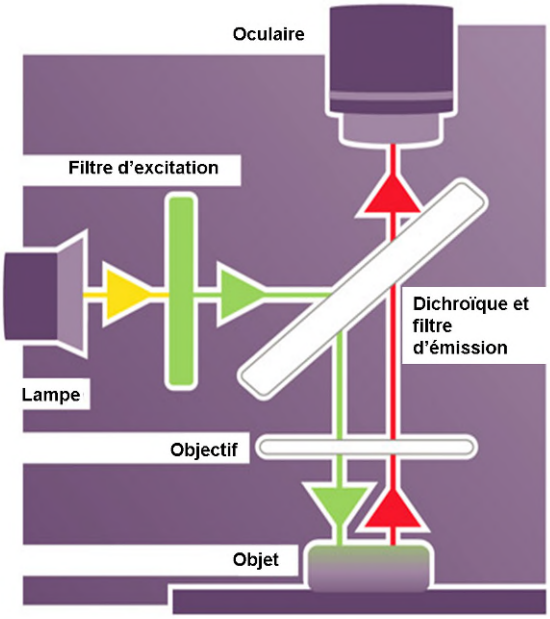



Fig II.D.5. Schéma d'un microscope inversé à épi-fluorescence.

Le principal défaut de la microscopie de fluorescence classique est l'absence de résolution en $z$ : la fluorescence hors focus gène l'observation car toute la fluorescence provenant de

l'échantillon arrive à l'oculaire (ou au détecteur). Ceci est particulièrement gênant dans le cas d'un tridimensionnel. C'est pourquoi il a été nécessaire de réaliser des observations avec un microscope confocal, permettant une meilleure visualisation en *z* des GUV.

## II.D.3 - Microscopie confocale

Le principe de la microscopie confocale est de filtrer spatialement la lumière afin que seule la lumière issue du plan focal soit détectée. Le microscope confocal reprend le principe du microscope à fluorescence mais la source lumineuse est un laser. Pour éliminer la fluorescence parasite, un trou de filtrage (« pinhole » en anglais) est placé en amont du détecteur (une caméra CCD la plupart du temps). Le trou confocal a pour but de sélectionner uniquement les photons provenant du plan focal de l'objectif.

Ainsi, des sections optiques pourront être réalisées puis combinées pour former des images en trois dimensions. L'image ainsi obtenue présente un bon rapport signal /bruit.

Il existe deux principaux types de microscopes confocaux :

- Le microscope confocal classique est équipé d'un trou confocal ce qui lui permet d'éliminer la fluorescence hors focus. Il est également équipé de miroirs galvanométriques qui vont lui permettre de bouger la zone d'observation dans l'échantillon. Malheureusement, plusieurs minutes sont parfois nécessaires avant d'obtenir une image. En effet le balayage de l'échantillon prend du temps et pendant ce temps l'échantillon reste sous illumination. Mais la résolution spatiale de ce type de microscope peut être de l'ordre de la limite théorique de résolution optique.

- Le microscope confocal dit à « spinning disk » ou « nipkov » (**Pawley 2006**). Avec un microscope utilisant la technologie « Nipkov », l'effet confocal n'est pas obtenu en filtrant la lumière qui nous vient de l'échantillon par un trou confocal, mais par un disque tournant composé d'une vingtaine de lentilles et de trous confocaux (*fig II.D.7*). L'avantage de cette technique est d'avoir une plus grande résolution temporelle : les images peuvent être acquises en quelques millisecondes. En effet le balayage de l'échantillon est obtenu par la rotation du disque. De plus il y a moins de perte d'intensité dans ce type de montage. En effet le trajet optique est plus court que dans le cas précédent. Cependant, La résolution spatiale de ce type microscope est moins bonne que celle d'un confocal classique

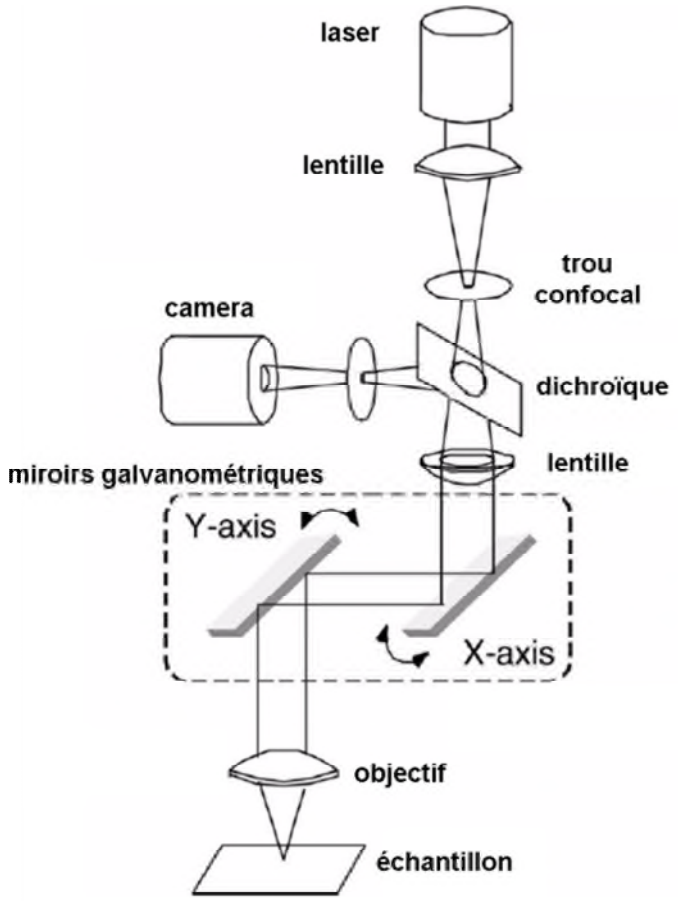



Fig II.D.6. Schéma d'un microscope confocal « classique ». Adapté de (**Pawley 2006**).

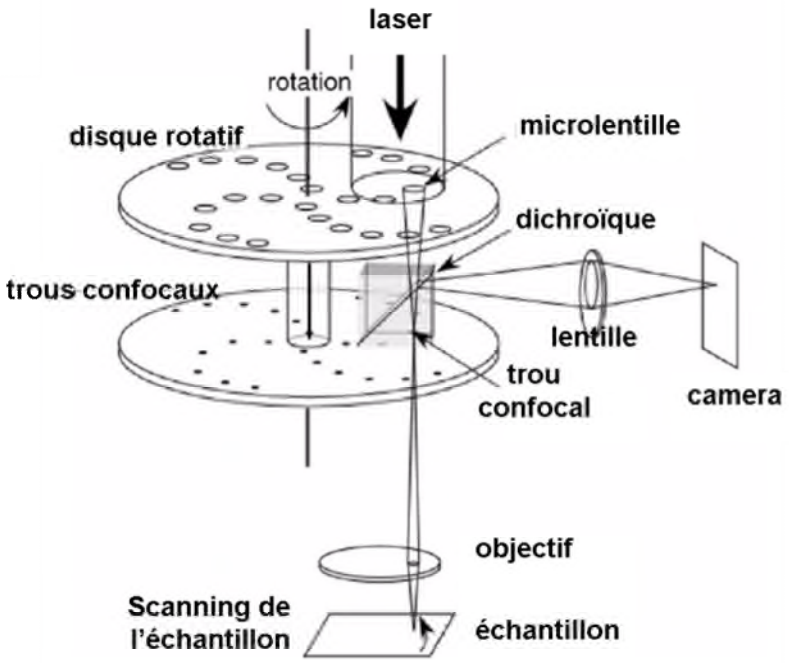



Fig II.D.7. Schéma d'un microscope confocal à « spinning disk ». Adapté de (**Pawley 2006**).

La résolution minimale en *z* d'un microscope confocal dépend de la longueur d'onde utilisée et de l'ouverture numérique de l'objectif selon l'expression :

$$z_{\min} = 2\lambda_0 n / (NA_{Obj})^2 \quad (3)$$

$NA_{Obj}$ est l'ouverture numérique de l'objectif, *n* est l'indice du milieu et $\lambda_0$ est la longueur d'onde du laser utilisé (**White et al. 1987**).

Les observations confocales de mon travail de thèse ont toutes été faites sur un « Rapid confocal imager Ultra view ERS » (Perkin Elmer), avec un objectif à huile à immersion 63X d'ouverture numérique 1.4. La résolution en *z* est calculée à 662 nm pour une excitation à 488 nm, et de 770 nm pour une excitation à 568 nm.

Les observations confocales ont permis d'observer la répartition du PIP2 dans la membrane ainsi que l'interaction vésicules / ezrine fluorescente.

## II.D.4 - Préparation des chambres d'observation

Afin d'observer les vésicules au microscope en contraste de phase ou en fluorescence, nous utilisons des puits autocollants, press-to-seal silicone isolator, 2.5 mm x 2.0 mm (Invitrogen), collés sur une lamelle de verre de 24 x 50mm (*fig II.D.8*). Le volume des chambres est de 15 µL. Avant d'y injecter les GUV, de la BSA est adsorbée au fond du puits (à 1 mg/mL pendant 15 min) afin d'éviter l'interaction des GUV ou de la protéine avec le fond du puits. La chambre est rincée à l'eau milliQ. La chambre d'observation est pré-remplie avec 13 µL de tampon d'ezrine neutralisé (contenant la protéine) ou de solution de glucose. Nous ajoutons environ 1 µL de la solution de GUV dans leur tampon de gonflement. Les GUV sont ainsi diluées par 14 dans le tampon d'ezrine neutralisé ou dans la solution de glucose. La lamelle contenant les micro-puits est placée sur la platine du microscope pour observation. Les GUV sédimentent dans le puits d'observation. Une fois au fond de la lamelle, les vésicules sont imagées en contraste de phase, fluorescence ou en confocal, à température ambiante.

Pour échanger le milieu dans lequel se trouvent les GUV nous procédons de la manière suivante : le tampon est ajouté sur le dessus de la chambre d'observation, puis au bout de quelques minutes, on enlève l'excédent de liquide à l'aide d'un papier buvard. Cette opération est recommencée plusieurs fois afin de progressivement changer le milieu dans lequel baignent les vésicules. Les expériences de lavage sont réalisées afin de voir la réversibilité de l'interaction GUV / ezrine et seront décrites au chapitre III.A.

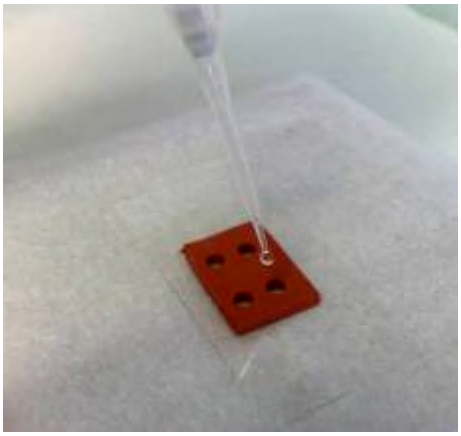


Fig II.D.8. Lamelle sur laquelle sont collés les puits qui vont nous servir à visualiser les GUV en microscopie. La solution est introduite à l'aide d'une micropipette.

## II.D.5 - Microscopie à onde évanescente (microscopie TIRF)

La microscopie en fluorescence à réflexion totale interne (à onde évanescente) a été utilisée pour observer la croissance de filament d'actine. La microscopie TIRF constitue un outil très puissant et adapté pour l'étude en temps réel de la polymérisation de l'actine (**Kuhn et al. 2005; Fujiwara et al. 2002**) . En effet, pour observer des filaments d'actine polymériser en temps réel, il est nécessaire de marquer directement les monomères d'actine avec une molécule fluorescente. Cependant, ainsi que nous l'avons vu précédemment, une observation microscopique classique permet d'observer un ensemble de molécules fluorescentes en solution. Dans le cas présent, le bruit de fond des monomères d'actine et des filaments qui diffusent librement vient masquer la fluorescence du signal produit par le filament d'actine qu'on souhaite observer. La microscopie à onde évanescente va permettre une observation très localisée des filaments (quelques centaines de nm) au voisinage de la lamelle de verre (**Amann et al. 2001**).

### *II.D.5.a - Principe du montage pour l'obtention de l'onde évanescente*

Dans ce type de microscopie, l'onde électromagnétique va être confinée à l'interface entre le milieu de fort indice de réfraction $n_1$ (typiquement la lamelle d'observation d'indice proche de 1.5) et le milieu de faible indice de réfraction $n_2$ (le milieu contenant la solution à étudier, d'indice proche de 1.33). Une onde évanescente est créée en jouant sur l'angle d'incidence du faisceau laser à l'interface entre l'objectif et la lamelle d'observation. Pour un

angle supérieur à l'angle critique, $\theta_{critique}$, il y a une réflexion totale interne du laser dans le verre. L'angle critique de réflexion totale interne est :

$$\theta_{critique} = Arc\sin(\frac{n_2}{n_1}) \qquad (4)$$

Une onde évanescente se propage alors à l'interface verre/milieu aqueux, dans le milieu de plus faible indice.

Le faisceau sort de l'objectif en incidence rasante, est réfléchi à l'interface entre le verre de la lamelle et la solution, et revient dans l'objectif. L'onde évanescente est alors créée sur quelques centaines de nanomètres (typiquement 150 - 200 nm) directement à l'interface de la lamelle qui en contact avec l'objectif. L'intensité de l'onde évanescente est donnée par la relation :

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-z/d} \qquad (5)$$

Où $I$ est l'intensité de l'onde, $z$ est la distance parcouru dans le milieu, $d$ est la longueur de pénétration de l'onde

$$\text{et } d = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin\theta - n_2^2}} \qquad (6)$$

Où $n_1$ et $n_2$ sont les indices optiques des milieux et $\theta$ l'angle d'incidence (**Amann et al. 2001**). L'onde évanescente permet une observation de phénomènes localisés ayant lieu à proximité de la lamelle dans une zone optiquement limitée à ~300 nm. Ainsi, le bruit de fond de la solution est éliminé grâce au principe physique de cette onde.

Le montage TIRF qui a été utilisé durant mes expériences est schématisé sur la figure (*fig II.D.9*). Il utilise l'objectif lui-même comme prisme. Néanmoins, ceci n'est possible que si l'objectif possède une grande ouverture numérique. En effet, l'angle $\theta_{max}$ le plus grand possible est tel que : $NA = n_1 \cdot \sin\theta_{\max}$, avec $n_1$ l'indice de réfraction de l'huile d'immersion. On doit donc, d'après l'équation, avoir $NA > n_2$. Il existe donc des objectifs « spécial TRIF » ayant une ouverture numérique supérieure à 1.4.

Lors de ma thèse, les observations TIRF ont été réalisées sur un microscope inversé Nikon TE Eclipse équipé d'un module FRAP / TIRF et d'une ligne laser (raies : 405 nm, 491 nm, 561 nm) et d'un objectif x100 d'ouverture numérique de 1.49, au sein de l'équipe de L. Blanchoin (iRSTV, CEA Grenoble). Le microscope TIRF est également équipé d'un module de correction du focus ce qui permet de suivre une polymérisation d'actine sur plusieurs dizaines de minutes. Durant l'expérience il est possible que la position de la lamelle fluctue

légèrement. Sans le module de correction du focus il est courant de « perdre de vue » les filaments que nous étions en train d'observer : s'ils sortent de l'onde évanescente, ils ne seront plus visibles.

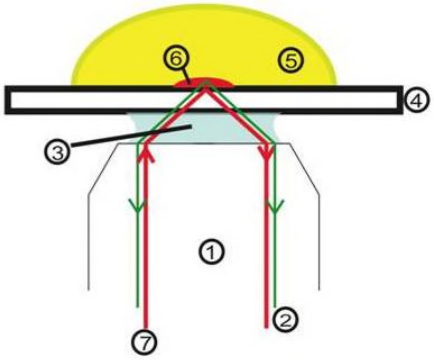



Fig II.D.9. Montage pour une illumination en onde évanescente. Indication 1) objectif, 2) lumière émise par l'échantillon, 3) huile d'immersion, 4) lamelle, 5) solution, 6) onde évanescente, 7) laser, 8) glycérol, 9) prisme.

### ***II.D.5.b - Préparation des échantillons pour l'observation en microscopie TIRF***

La polymérisation d'actine se fait toujours à des concentrations proches de 1 µM, ainsi la dynamique de polymérisation est lente et il est possible de suivre convenablement un filament unique pendant quelques dizaines de minutes. Afin d'éviter des fluctuations thermiques trop grandes qui empêcheraient de prendre des images nettes des filaments, les expériences sont réalisées avec en permanence 0.5 % de methylcellulose dans le milieu. Celle-ci permet d'augmenter la viscosité du milieu (proche de 10 cP, soit dix fois plus visqueux que l'eau).

Le mélange contenant les protéines et le lipide est réalisé dans un volume de 30 µL dans un Eppendorf. Les lamelles de verres ne sont pas recouvertes de BSA, mais la BSA est ajoutée dans le mélange afin d'éviter que les filaments ne s'adsorbent sur la lamelle de verre, ce qui inhiberait leur croissance.

5 µL du mélange de protéines est déposé sur une lamelle de verre, puis une second lamelle est mise au contact de la première afin d'écraser la goutte. Celle-ci va remplir l'espace entre les deux lamelles. Ensuite les lamelles sont posées ainsi sur la platine du microscope (*fig II.D.10*), les observations se font à température ambiante.

Fig II.D.10 : Une goutte du mélange réactionnel est disposée au milieu d'une première lamelle. Avec la seconde lamelle que nous laissons tomber sur la première, nous écrasons la goutte.

## II.D.6 – Analyses d'images

Des études quantitatives sont réalisées sur la répartition des différents constituants marqués en fluorescence. Pour le système vésicules géantes nous avons analysé la répartition du PIP2 au sein de la membrane ainsi que la répartition de l'ezrine. Les analyses des expériences de microscopie TIRF sont surtout des analyses de suivi (« tracking ») des filaments afin d'en obtenir la taille et la vitesse de croissante. L'ensemble des images sont analysées avec ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/ij/).

### *II.D.6.a – Visualisation du marquage de la membrane dans une solution fluorescente*

Lorsqu'une GUV est plongée dans un milieu contenant de l'ezrine fluorescente, la membrane des vésicules se marque éventuellement en fluorescence. A l'aide du module complémentaire de ImageJ « radial profile plot », les intensités sont intégrées sur des cercles concentriques partant du centre de la GUV jusqu'à l'extérieur de celle-ci. Nous utilisons toujours la même quantité d'ezrine fluorescente, néanmoins, la concentration d'ezrine totale peut varier (cela dépend du rendement de la purification). De plus, l'acquisition n'est pas toujours faite avec les mêmes temps d'exposition ou la même puissance du laser. Donc afin de comparer le marquage des différentes GUV nous normalisons l'intensité.

L'intensité de fluorescence est $I_{INT}$ à l'intérieur de la GUV (pas de fluorescence), et elle est $I_{EXT}$ à l'extérieur, loin de la membrane de la GUV (solution fluorescente). L'intensité de fluorescente normalisée est calculée :

$$I_{NORM} = (I - I_{INT})/(I_{EXT} - I_{INT}) \quad (7)$$

Où I est l'intensité mesurée au niveau de la membrane de la vésicule. Cette normalisation donne au centre de la GUV $I_{NORM} = 0$ et à l'extérieur de la GUV $I_{NORM} = 1$.

Nous pouvons tracer l'intensité normalisée du centre jusqu'à l'extérieur de la GUV (*fig II.D.11)*. Une GUV dont la membrane est marquée en fluorescence présentera au niveau de sa membrane un pic d'intensité normalisée supérieur à 1.

Les GUV étant toutes de tailles différentes, nous représentons $I_{NORM}$ en fonction d'un rayon normalisé $R_{NORM} = r/R$ où $r$ représente la distance par rapport au centre de la GUV et $R$ est le rayon de la GUV. Ceci permet de comparer directement le marquage entre les différentes GUV. Nous définissons une GUV marquée à la membrane quand le pic d'intensité sur la membrane est supérieur d'au moins 15% à l'intensité à l'extérieur de la GUV.

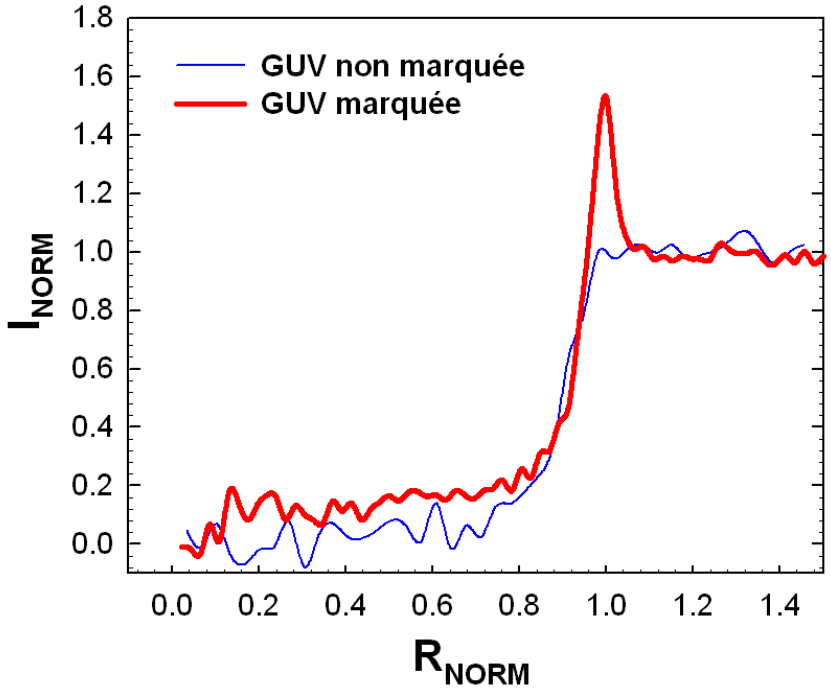



Fig II.D.11. Profil radial de GUV en contact avec de l'ezrine fluorescente en fonction du rayon normalisé. En abscisse la membrane de la GUV est située à $R_{NORM} = 1$.

### ***II.D.6.b - Quantification de l'hétérogénéité de la membrane des GUV***

Le module complémentaire « Oval profile plot » de ImageJ permet de mesurer le profil d'intensité de long de la membrane de la vésicule. Le profil d'intensité a été mesuré sur une région de 5 pixels d'épaisseur autour de la membrane afin de réduire le bruit. L'intensité moyenne du profil $I_{MEAN}$ est mesurée. La déviation standard $\sigma$ du profil d'intensité le long de la membrane représente l'hétérogénéité de la membrane : plus $\sigma$ est grand, plus la membrane est hétérogène (**Römer et al. 2007**).

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma(x-\overline{x})^2}{(n-1)}} \qquad (8)$$

Où $x$ est la valeur d'intensité du n$^{\text{ième}}$ point et $\overline{x}$ est la moyenne d'intensité du profil.

Pour comparer l'hétérogénéité de marquage des GUV dans différentes conditions, nous comparons les différents rapports $\frac{\sigma}{IMean}$ que l'on exprime en pourcentage de l'intensité moyenne du profil *IMean*.

Lorsque les GUV sont marquées en fluorescence de façon homogène à l'échelle d'observation, on mesure un rapport $\frac{\sigma}{IMean} \approx (10 \pm 2)\%$. Par la suite, nous considérerons qu'une GUV a un marquage homogène lorsque $\frac{\sigma}{IMean} \approx 10\ \%$ et qu'elle est marquée d'une façon hétérogène lorsque $\frac{\sigma}{IMean} \geq 15\%$ (*fig II.D.12).* Ce type d'analyse sera appelé analyse de déviation standard.

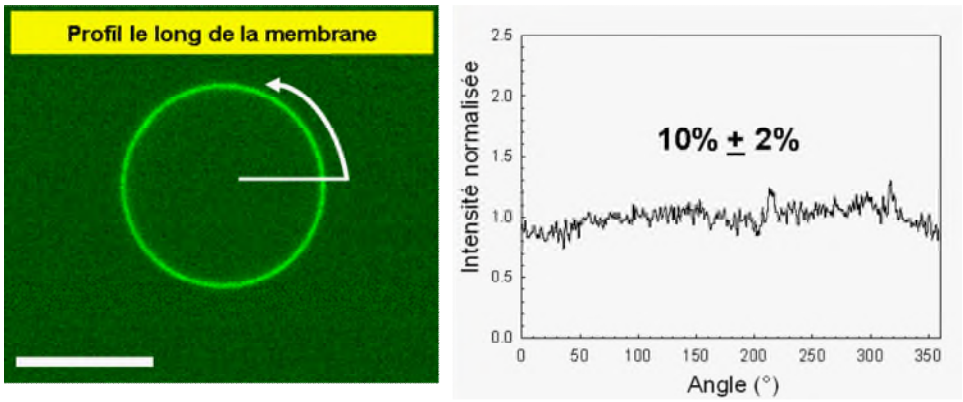



Fig II.D.12. Profil d'intensité le long d'une GUV homogène. Le pourcentage indique la valeur obtenue pour $\sigma$ / *IMean* La barre représente 10 µm.

***II.D.6.c - Analyses des images issues du TIRF***

***II.D.6.c.1 – Mesure des vitesses d'élongation, de la constante $k_+$ et de la taille moyenne des filaments***

L'extrémité des filaments est suivie tout au long des acquisitions à l'aide du module complémentaire « Manual tracking » de ImageJ. Les vitesses de croissance des filaments sont déduites de la taille mesurée et de la durée de l'observation au microscope.

Les vitesses d'élongation sont converties en nombre de monomères d'actines par seconde (un micromètre de filament d'actine est constitué de 333 monomères) (**Pollard 1986**).

La vitesse d'élongation *v* s'exprime en fonction des constantes d'association et de dissociation et de la concentration en actine selon :

$$v = k_+ \times [c] - k_- \quad (9)$$

Où [c] est la concentration d'actine, $k_+$ et $k_-$ sont les constantes d'association et de dissociation des monomères sur le filament. A partir de l'expression *(9)*, $k_+$ est exprimé en fonction de la vitesse d'élongation :

$$k_+ = v/([c] - [c_c]) \quad (10)$$

Où v est la vitesse d'élongation, [c] est la concentration d'actine et $[c_c]$ est la concentration critique ($[c_c] = k_- / k_+$). De la mesure de la vitesse d'élongation nous pouvons à l'aide de l'expression *(10)* déduire la constante d'association $k_+$.

***II.D.6.c.2 – Mesure de la densité de filaments dans le champ d'observation***

La densité de filaments sur la lamelle est quantifiée par l'intensité de fluorescence moyenne du champ observé. En effet plus nous avons de filaments sur une image et plus l'intensité moyenne de l'image sera élevée. Nous prenons une région d'intérêt sur le champ d'observation. Nous seuillons en intensité l'image de manière à ne faire apparaître sur l'image que les filaments. Nous mettons tous les pixels en dessous du seuil à 0, et tous les pixels au dessus du seuil à 1 (*fig II.D.11*). Cette étape est l'étape de binarisation. Une image est obtenue

où les filaments sont blancs sur un fond noir. L'évolution de la densité de filaments est évaluée en mesurant l'intensité moyenne du champ d'observation des images binaires.

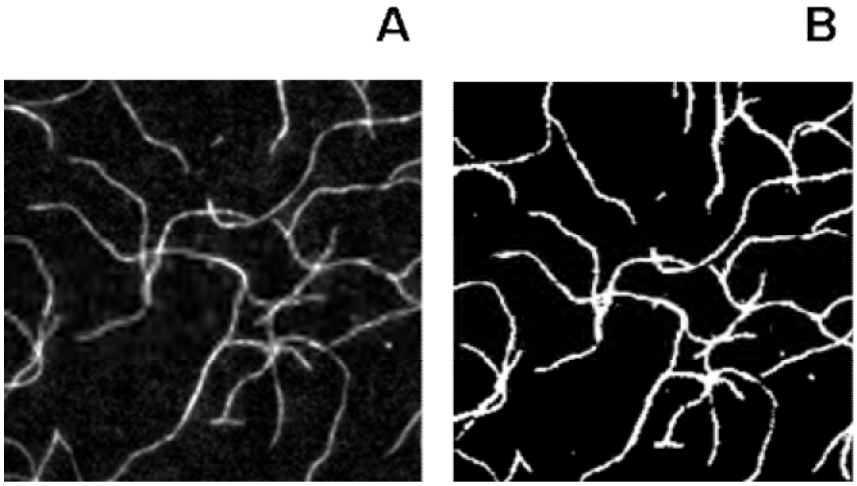



Fig II.D.11 : (A) image de filaments d'actine en TIRF. (B) image des mêmes filaments d'actine binarisée.

# II.E – Techniques de biochimie

Ma thèse étant située à l'interface de la physique et de la biologie, j'ai été amené à utiliser des techniques qui sont communément employées en biochimie.

## II.E.1 - Gels d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Cette technique est couramment utilisée lorsque l'on veut connaître le poids moléculaire d'une protéine et évaluer son niveau de pureté (**Laemmli 1970**). La protéine migre dans un gel réticulé de polyacrylamide sous l'effet d'un champ électrique. La vitesse de migration, et donc la position de la protéine, va dépendre de la taille de la protéine. Les protéines sont dénaturées par du dodécylsulfate de sodium (SDS), une molécule tensioactive chargée négativement. Les charges négatives du SDS vont masquer les charges propres de la protéine. Les charges de la protéine n'interviennent plus dans la migration de celle-ci. La charge de l'ensemble protéine/SDS (et donc sa vitesse de migration) dépend uniquement de la longueur de la chaine protéique.

La solution contenant les proteines est bouillie pendant 3 minutes avec une solution dite de Laemmli contenant du SDS (4%) et un colorant, le bleu de bromophénol (0.004 %). Ensuite, un volume de 20 µl de la solution est déposée dans le gel de migration *(fig II.E.1(A))*. Pour commencer la migration, un courant de 20 mA est appliqués entre l'anode et la cathode. Quand la migration est achevée, le gel est plongé dans un colorant qui va colorer les bandes de protéines. Chaque molécule apparait comme une bande fine, perpendiculaire au trajet de migration et dont l'intensité et l'épaisseur dépendent de la concentration de la protéine *(fig II.E.(B))*.

Les gels d'électrophorèse sont utilisés afin d'attester de la pureté de l'ezrine purifiée. En effet, après la purification, l'ezrine est déposée sur gel où il sera possible de vérifier son poids moléculaire et sa pureté (s'il n'y a que de l'ezrine et pas de contaminants, une seule bande sera observée) (*fig II.B.2 et fig II.E.2(B)*). Cette technique est également utilisée lors des expériences de Western Blot.

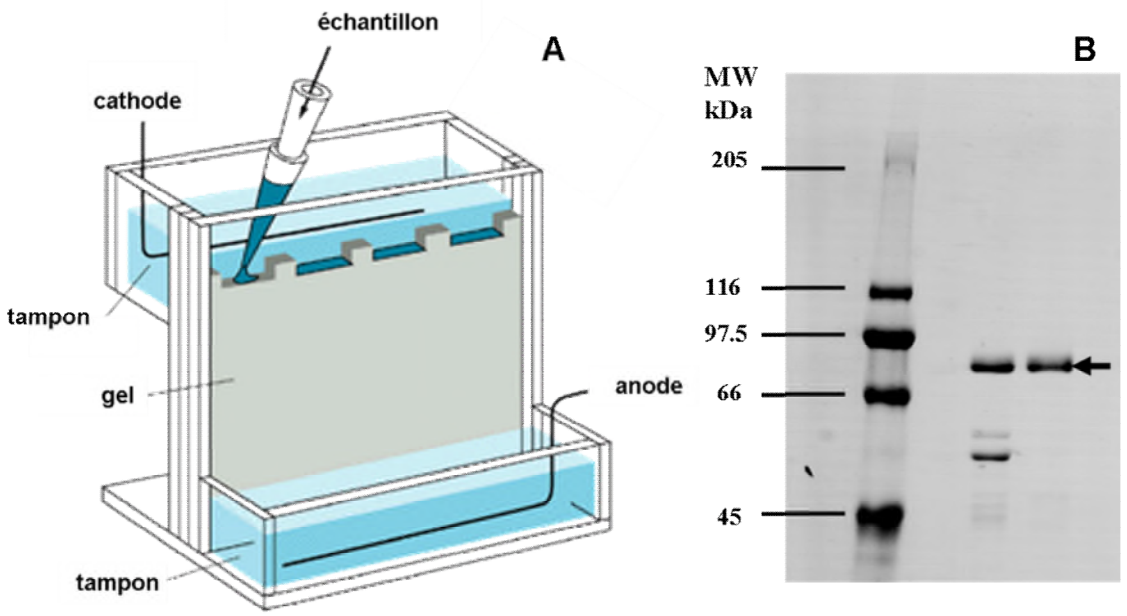



Fig II.E.2. (A) Schéma du montage pour effectuer un gel d'électrophorèse. (B) Exemple de gel d'électrophorèse avec dans la piste à gauche les marqueurs de poids moléculaires et dans les pistes de droite deux préparations d'ezrine de pureté différente. La flèche indique l'ezrine à 80kDa.

## II.E.2 – Marquages des GUV avec des anticorps fluorescents

Afin de vérifier l'incorporation de PIP2 dans les GUV, des marquages en immunofluorescence ont été réalisés. Les anticorps primaires anti-PIP2 sont des anticorps de souris de chez Assay Designs (Ann Arbor, MI). Les anticorps secondaires utilisés sont soit des anticorps de lapin-anti souris couplés à un fluorophore Alexa 568 (RAM-Alexa568), soit des anticorps de chèvre anti-souris non fluorescents (fabriqués au laboratoire par C. Roy). Les anticorps tertiaires sont des anticorps âne anti-chèvre couplés à un fluorophore Alexa 488 (DAG-Alexa488) de chez Molecular Probes (Eugene, OR).

Les GUV sont diluées 10 fois dans le tampon d'ezrine neutralisé. Nous préparons 100µl de ce même tampon avec en plus 1µl d'anticorps primaires et 1µl d'anticorps secondaires fluorescents (ou avec 1µl d'anticorps primaires, 1µl d'anticorps secondaires non fluorescents et 1µl d'anticorps tertiaires fluorescents). Après ajout de 100µl de la solution contenant les anticorps à 100µl de la solution contenant les GUV, les deux solutions sont mélangées délicatement avec une pipette Pasteur. Nous laissons incuber 1 heure dans un endroit sombre. Ensuite les vésicules sont observées en microscopie de fluorescence.

## II.E.3 – Western Blot

Le Western Blot est une technique qui utilise des anticorps spécifiques afin de permettre l'identification de protéines dans un échantillon. Deux types d'anticorps ont été utilisés : un anticorps anti-ezrine (fabriqué au laboratoire) et un anti- PIP2 (Ann Arbor, MI). Concrètement, après un gel d'électrophorèse, les bandes de protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinyldiène (PVDF). Ces membranes de PVDF vont être tout d'abord mises en contact avec de la BSA et des protéines de lait afin de réduire l'adsorption non spécifique des anticorps sur la membrane. La membrane est mise au contact d'une solution contenant les anticorps primaires (anti- PIP2 ou anti-ezrine). Ensuite un anticorps secondaire portant une enzyme est mis en contact avec la membrane. Pour révéler les pistes, il ne reste plus qu'à ajouter le substrat de l'enzyme porté par les anticorps secondaires. L'enzyme va réagir avec le substrat et les anticorps tertiaires vont devenir luminescents. Les pistes sont révélées par photoluminescence à l'aide d'un kit ECL (Pharmacia) (*fig II.E.3*).

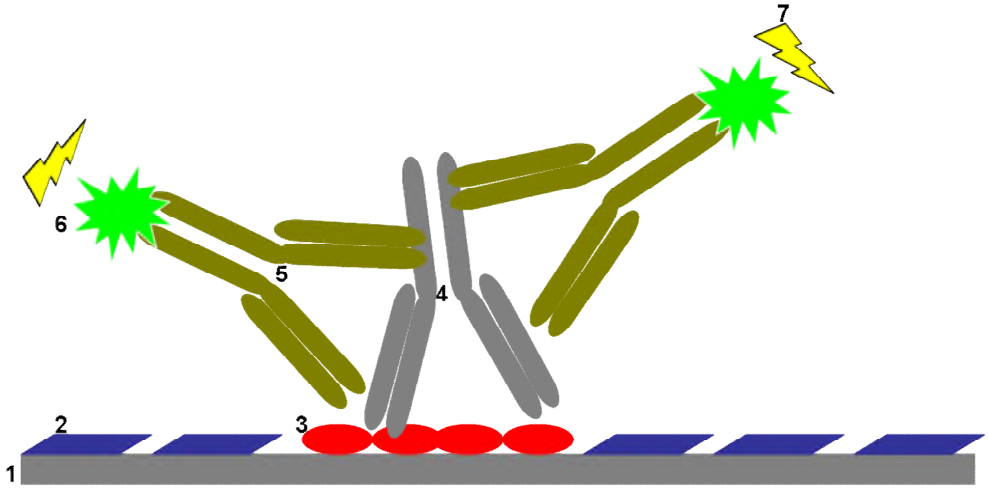



Fig II.E.3. Principe du Western Blot avec (1) la membrane de PVDF, (2) protéines qui réduisent l'absorption non spécifique sur la surface, (3) espèce que l'on veut détecter, (4) anticorps primaire, (5) anticorps secondaires, (6) enzyme, (7) substrat.

# II.F – Techniques physiques

## II.F.1 – Diffusion de lumière

### *II.F.1.a - Principe et rappels théoriques*

Lorsque de la matière est illuminée par un rayonnement de lumière visible il existe une interaction matière / rayonnement. Le champ électrique du rayonnement incident interagit avec les molécules de l'échantillon, plus précisément avec les électrons. Localement le champ électrique du rayonnement incident va induire une polarisation oscillante. Les molécules se comportent comme des sources secondaires et elles vont réémettre une lumière avec une longueur d'onde peu différente de la lumière incidente. La diffusion de lumière n'est pas élastique, mais quasi-élastique. Le principe de l'expérience est schématisé en (*fig II.F.1*).

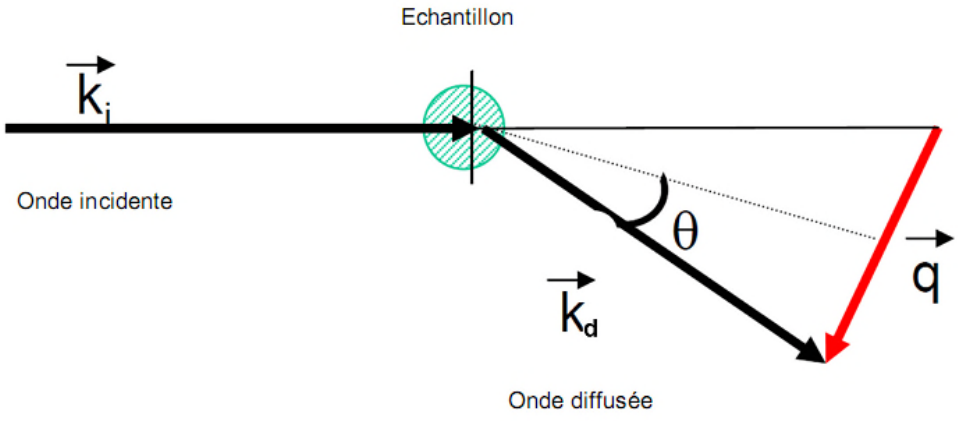



Fig II.F.1 : un échantillon est éclairé par un laser, $\vec{k}_i$ est le vecteur d'onde incident et $\vec{k}_d$ est le vecteur d'onde diffusée.

On introduit le vecteur de diffusion $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_d$, où $\vec{k}_i$ et $\vec{k}_d$ sont respectivement le vecteur d'onde incident et le vecteur d'onde diffusée. En diffusion quasi-élastique nous avons :

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda}.\sin(\theta/2) \qquad (11)$$

avec $n$ l'indice du milieu, $\lambda$ la longueur d'onde incidente et $\theta$ l'angle de diffusion. L'intensité totale mesurée est égale au module de la somme des champs diffusés par chaque particule. Soit $\vec{E}_M$ le champ émis par la $M^{ième}$ particule, alors :

$$I_{TOT} = \left| \sum_M \vec{E}_M \right|^2 \qquad (12)$$

Une mesure de l'intensité des champs diffusés par chaque particule $M$ est effectuée selon une direction donnée. Si $I_0(q)$ représente l'intensité moyenne dans le temps diffusée avec un vecteur d'onde $q$, l'intensité instantanée s'écrit :

$$I(q,t) = \left|\vec{E}(q,t)\right|^2 = I_0(q).\sum_{M,N} \exp[\, j.\vec{q}.(\vec{r}_M(t) - \vec{r}_N(t)] \qquad (13)$$

Où $\vec{r}_M(t)$ (respectivement $\vec{r}_N(t)$ ) désigne la position de la $M^{ième}$ (respectivement de la $N^{ième}$ ) particule à l'instant t.

***II.F.1.b – Diffusion statique***

Nous mesurons l'intensité diffusée par l'échantillon en fonction de l'angle de diffusion. Généralement l'intensité moyenne diffusée est directement proportionnelle au nombre et au carré de la masse des particules en suspension.

$$I \propto n.m^2 \quad (14)$$

Où $n$ est le nombre de particule et $m$ la masse des particules. Pour un mélange de deux type de particules de masse $m$ et de masse $M$ nous avons :

$$I \propto (n.m^2 + N.M^2) \quad (15)$$

Lorsque nous avons une seule espèce de masse $m$ en solution qui forme des multimères pour donner une deuxième espèce de masse $M$, alors nous pouvons évaluer la quantité relative de chaque espèce en calculant le rapport $I/I_0$.

***II.F.1.c – Diffusion dynamique***

La diffusion dynamique de lumière (DLS) est très largement utilisée pour mesurer la taille de particules en suspensions. Lors de nos expériences, la taille de l'ezrine et de l'ezrine interagissant avec le PIP2 a été mesurée à l'aide de cette technique. Le spectre de la lumière diffusée est reliée au mouvement brownien des particules en solution, et donc à leurs coefficient de diffusion $D$, qui lui est relié à la taille des particules (**Pecora 1985**).

Dans la configuration précédente, pour $\vec{q}$ fixé, la fonction d'autocorrélation sur l'intensité diffusée est définie par :

$$g_2(t) = \frac{\langle I(t=0)I(t)\rangle}{\langle I(t)\rangle^2} \quad (16) \quad \text{ou} \quad g_1(t) = \frac{\langle \vec{E}(t=0)\vec{E}^*(t)\rangle}{\langle \vec{E}(t)\rangle^2} \quad (17)$$

Expérimentalement c'est l'intensité du champ électrique diffusé qui est mesurée : seule la fonction $g_2(t)$ est accessible. La relation de Siegert relie $g_1(t)$ à $g_2(t)$ tel que :

$$g_2(t) = 1 + \beta\, g_1(t) \qquad (18)$$

Où β, le coefficient de Siegert, traduit la zone de cohérence mesurée, c'est-à-dire le volume dans lequel est effectuée la mesure. Ce coefficient dépend du montage expérimental, c'est-à-dire de sa géométrie (**Siegert 1943**).

Pour une suspension diluée de particules monodisperses en taille et sans interactions nous avons $g_1(t)$ qui a la forme d'une exponentielle simple :

$$g_1(t) = e^{-\frac{q^2\langle \Delta r^2(t)\rangle}{6}} \qquad (19)$$

Où $\langle \Delta r^2(t)\rangle$ est le déplacement quadratique moyen des particules. Le coefficient de diffusion $D$ est défini comme $\langle \Delta r^2(t)\rangle = 6\,D\,t$. Il est relié au rayon $r$ de la particule par la relation de Stokes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \qquad (20)$$

Ou $T$ est la température en Kelvin, $\eta$ la viscosité du milieu et $k_B$ la constante de Boltzmann. Le coefficient de diffusion est aussi relié au temps caractéristique $\tau$ de décroissance de la fonction de corrélation et au vecteur d'onde par la relation suivante :

$$\frac{1}{\tau} = Dq^2 \qquad (21)$$

Pour les solutions polydisperses, l'analyse de la fonction de corrélation n'est plus simple. Dans ce cas là il y a plusieurs méthodes pour traiter la fonction de corrélation. Par exemple, il possible de faire une décomposition de la fonction d'autocorrélation en une somme de fonctions exponentielles ou bien d'utiliser des transformation de Legendre afin de faire apparaître les différents temps caractéristiques.

***II.F.1.d – Montage expérimental, préparation des échantillons et analyse***

Le montage expérimental est constitué d'un laser de puissance maximale de 100 mW et de longueur d'onde $\lambda = 514.5$ nm. Le goniomètre AMTEC (AMTEC, Nice, France) porte 2 photomultiplicateurs. Les photomultiplicateurs fournissent des impulsions d'électrons qui sont envoyés à un corrélateur Brookhaven BI9400 (Brookhaven Instrument Corp., Holtsville, NY). Les expériences sont réalisées à 25°C.

L'analyse de la fonction de corrélation issue de l'ezrine en solution se fait en ajustant une fonction monoexponentielle sur la fonction de corrélation. Nous déterminons pour chaque angle de diffusion un temps caractéristique $\tau$. Ensuite nous représentons $1/\tau$ en fonction de $q^2$. En accord avec les relations *(20)* et *(21)*, la pente de la droite permet de calculer le rayon de la protéine.

La solution contenant la protéine est mise dans un tube en verre fermé par un bouchon en plastique. Toutes les solutions sont préalablement filtrées à l'aide d'un filtre de 0.22 µm. Le volume d'observation est de l'ordre de 1ml. L'ezrine est à une concentration de 12.5µM, l'acquisition est faite à plusieurs angles et le temps d'acquisition est de 20 minutes par mesure au minimum. Une mesure est effectuée avec les tampons afin de s'assurer que les solutions utilisées ne contiennent pas d'impuretés pouvant fausser les mesures. Ensuite nous pouvons mesurer l'échantillon contenant les protéines.

Lorsque nous ajoutons du PIP2 à l'ezrine, nous avons plus d'un seul temps caractéristique et dans ce cas l'analyse des résultats se fait en utilisant l'algorithme CONTIN ou NNLS à l'aide du logiciel DLS-BIC software (Brookhaven Instrument Corp., Holtsville, NY). L'algorithme CONTIN utilise une analyse en transformée de Laplace inverse de la fonction de corrélation (**Provencher 1982**). L'analyse à l'aide de l'algorithme NNLS est basée sur une décomposition en somme d'exponentielles de la fonction de corrélation. Chaque exponentielle nous donne un temps caractéristique correspondant à une particule de taille déterminée (**Morrison et al. 1985**).

## II.F.2 – Expériences de fluorescence du tryptophane

### *II.F.2.a - Principe*

Les protéines sont intrinsèquement fluorescentes. Certains acides aminés sont fluorescents, par exemple la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine. Le tryptophane représente environ 1% des acides aminés présent dans les protéines. Il contient un hétérocycle indole qui lui confère des propriétés d'absorption et de fluorescence dans l'ultraviolet (*fig II.F.2)*. Les caractéristiques de l'émission de fluorescence, longueur d'onde et intensité, peuvent être modulées par son environnement (**Lakowicz 2006**). C'est pourquoi la fluorescence intrinsèque du tryptophane constitue un outil de choix pour visualiser les changements de conformation d'une protéine. L'ezrine contient 7 résidus tryptophane.

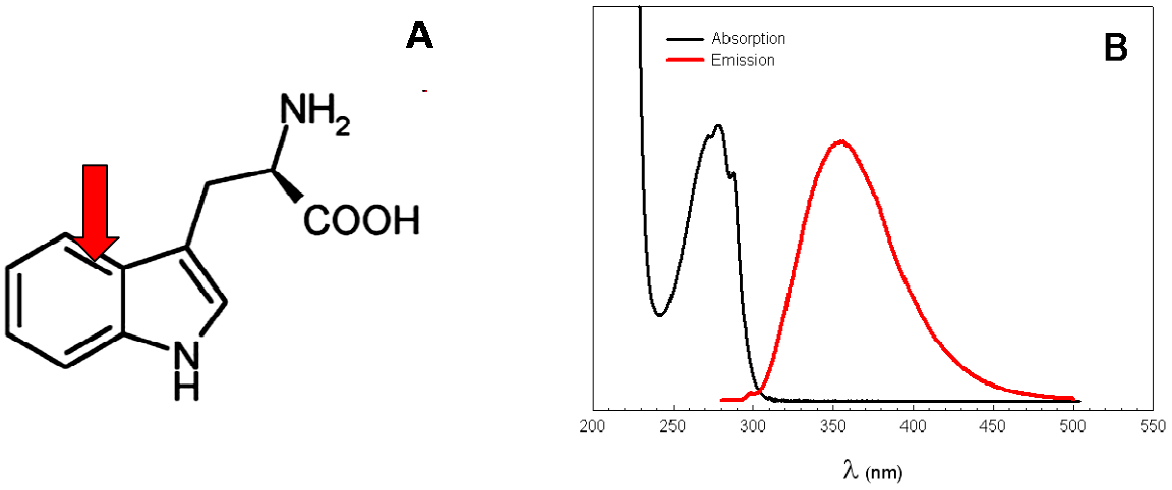



Fig II.F.2 : (A) Structure chimique du tryptophane, la flèche pointe l'hétérocycle indole et (B) spectre d'absorption et d'émission dans un tampon phosphate 0.1M à pH 7.4.

Lorsque les résidus tryptophane sont exposés à un environnement apolaire (le cœur hydrophobe d'une protéine par exemple), le maximum d'émission se situe à 330 nm et l'intensité de fluorescence est maximale. A contrario lorsque le tryptophane est exposé à un environnement polaire, comme de l'eau, le maximum d'émission se décale vers le rouge et l'intensité de fluorescence diminue.

### ***II.F.2.b – Montage expérimental et préparation des échantillons***

Les expériences de fluorescence intrinsèque du tryptophane sont réalisées sur un spectromètre de luminescence LS50B (Perkin). On excite à une longueur d'onde de 280 nm et on réalise le spectre de 300 nm à 400 nm à une vitesse de 50 nm par minute. Les fentes d'émission et d'absorption sont de 2.5 nm. Les cuves de fluorescence de 60µl sont en quartz. La protéine est injectée dans la cuve, puis le PIP2. Nous mélangeons à l'aide d'une pipette et attendons 3 à 5 minutes. L'acquisition est faite à température ambiante.

## II.F.3– Mesure du potentiel zêta des vésicules

### ***II.F.3.a – Définition du potentiel zêta et principe de mesure***

A l'interface entre une surface chargée et une solution électrolytique, il existe une couche de solution qui possède des propriétés différentes de celles du réservoir (**Israelachvili 1991**). Nous nous intéressons au modèle de la double couche de Stern (*fig II.F.3*).

Dans ce modèle, une première couche de contre ions immobiles est présente au contact de l'interface chargée : c'est la couche compacte. Elle est suivie d'une seconde couche d'ions mobiles dans l'électrolyte : c'est la couche diffuse. Le plan de jonction entre la couche compacte et la couche diffuse est le plan de cisaillement. On nomme potentiel zêta, $\zeta$, le potentiel électrostatique au plan de cisaillement (**Hunter 1981**).

A cause de l'immobilité des ions de la couche compacte, c'est $\zeta$ et non pas le potentiel électrostatique $\psi 0$ de la surface chargée qui intervient dans les phénomènes électrocinétiques. Dans ce modèle, l'épaisseur de la double couche (couche compacte + couche diffuse) est un paramètre essentiel, permettant de caractériser la décroissance du potentiel. Cette épaisseur est appelée longueur de Debye et notée $\kappa^{-1}$. Cette longueur dépend de la force ionique de la solution : elle diminue lorsque la force ionique augmente.

$$\kappa = \sqrt{\frac{\sum_i \rho_i e^2 z_i^{\,2}}{\varepsilon k T}} \qquad (21)$$

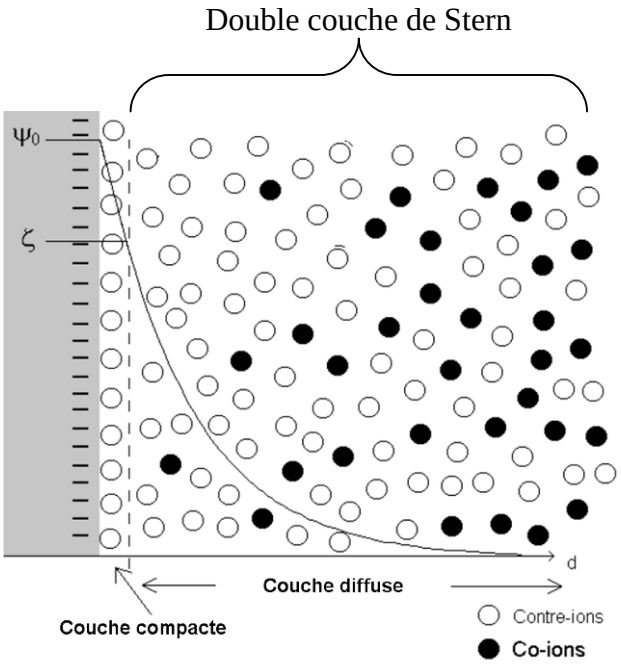



Fig II.F.3 : modèle de la double couche de Stern, avec ψ0 le potentiel électrostatique et ζ le potentiel zêta. Adapté de Israelachvili (**Israelachvili 1991**).

Où $\rho_i$ est la concentration de l'ion i dans le réservoir, $z_i$ la charge de l'ion i, ε la permitivité électrique du milieu, *e* la charge de l'électron, *k* la constante de Boltzmann et *T* la température en K. A température ambiante la longueur de Debye est de 1µm dans de l'eau pure, et elle est de 3nm à une concentration de $10^{-2}$ mol en sels monovalents. Dans la solution de gonflement des vésicules elle est de 9 nm.

Lorsqu'on applique un champ électrique à une suspension contenant des colloïdes chargés, ceux-ci acquièrent une certaine mobilité dépendant de leurs charges et de leur cortège électronique. Les ions ayant une forte affinité pour la surface (ions qui se situent dans la couche compacte) accompagnent le colloïde dans son mouvement alors que les ions ayant une affinité plus faible se séparent progressivement de la surface. La valeur du potentiel ζ est accessible par des mesures électrocinétiques. Le principe des mesures électrocinétiques repose sur la mesure de la mobilité électrophorétique de particules chargées en suspension. L'application d'un champ électrique entraine les particules vers l'électrode de charge opposée

à la charge de la particule. La mobilité $\mu$ des particules se définit comme le rapport entre la vitesse $v$ de ces particules et le champ électrique appliqué E : $\mu = v/E$. La mobilité électrophorétique permet d'accéder à la valeur du potentiel zêta par la relation de Henry : $\mu = \frac{2\varepsilon\xi}{3\eta} f(\kappa a)$ *(22)*, où $\eta$ est la viscosité du liquide, $\kappa^{-1}$ est la longueur de Debye, $a$ est le rayon de la particule et $\varepsilon\varepsilon_0$ la constante diélectrique du liquide.

Le facteur $f(\kappa a)$ dépend de la forme de la particule. Dans le cas d'une particule sphérique dont l'épaisseur de la double couche est négligeable, $f(\kappa a) = 3/2$ et l'expression se simplifie à : $\mu = \varepsilon\xi/\eta$. Si la taille de la particule est négligeable devant la double couche, nous avons $f(\kappa a) = 1$ et $\mu = 2\varepsilon\xi/3\eta$.

***II.F.3.b – Montage expérimental***

Pour faire les mesures de potentiel zêta nous avons utilisé le zêta sizer Nano ZS de chez Malvern (Malvern, Worcestershire, United Kingdom) (*fig II.F.4*).

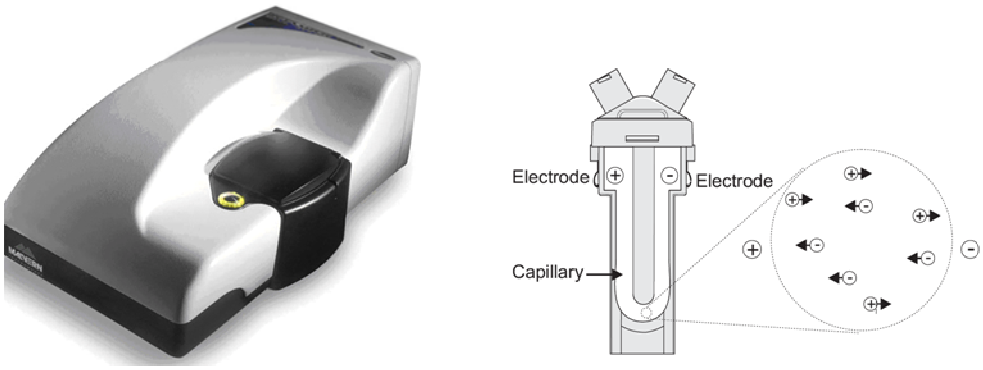



Fig II.F.4 : zêta sizer nano ZS et cellule de mesure du potentiel zêta. Adapté de Malvern.

Les cellules de mesure que nous utilisons pour la mesure du potentiel zêta ont un volume de 700µl. Les mesures sont faites à 25°C. Dans la chambre de mesure les vésicules sont soumises à un champ oscillant de 300V/cm. La vitesse des particules est mesurée par vélocimétrie doppler laser. Des franges d'interférences sont créées dans la cellule de mesure. Les particules soumises au champ électrique vont bouger dans ces franges d'interférence.

L'intensité des franges va être modulée à une fréquence directement proportionnelle à la vitesse des particules (*fig II.F.5).*

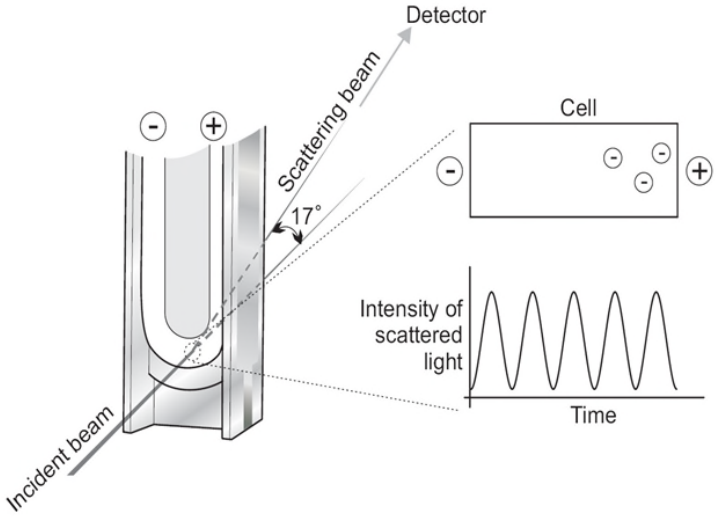



Fig II.F.5 : principe de la mesure par vélocimetrie laser. Adapté de Malvern

La mesure de la fréquence de modulation de l'intensité des franges, permet de calculer la vitesse des vésicules et donc de mesurer leur potentiel zêta.

La limitation de cette technique de mesure est la taille des particules : nous ne pouvons pas mesurer le potentiel sur des GUV dont le rayon et plus grand que 10 µm. Les mesures sont analysées à l'aide du logiciel DTS nano fourni avec le nano ZS.

***II.F.3.c – Préparation des échantillons et mesures***

Lorsque nous voulons mesurer le potentiel zêta des LUV, il suffit de remplir la cellule avec la solution contenant les petites vésicules. La solution de LUV est injectée dans la cellule de mesure à l'aide d'une seringue de 1ml.

Mais pour mesurer le potentiel zêta des GUV il faut d'abord s'assurer que la solution ne contient pas de petits agrégats de lipides. Ces agrégats peuvent fausser la mesure de la mobilité électrophorétique. De plus il ne faut pas que les vésicules sédimentent au risque de fausser la mesure de la mobilité.

Lors de l'électroformation, il faut porter une attention particulière à la manipulation des vésicules : les agrégats qui peuvent gêner en potentiel zêta sont surtout des agrégats produits

lors d'éclatement de vésicules. Aussi les vésicules ne sont jamais secouées ni pipetées pour ne pas les détruire.

Afin de vérifier la propreté de la solution de GUV nous diluons par 10 les GUV contenant du sucrose dans une solution de glucose. Les GUV sont centrifugée à 500 ou 1000 rpm pendant 30 minutes. Ensuite le surnageant est prélevé et observé en microscopie de phase ou de fluorescence : il n'y a aucun agrégat de lipides détectable en microscopie optique. Pour vérifier la « propreté » de la solution de GUV, nous pouvons également filtrer délicatement la solution sur 0.2µm et mesurer le potentiel zêta de la solution filtrée. Lorsque rien n'est mesurable nous supposons qu'il n'y a pas d'impuretés et que donc il n'y a aucuns agrégats de lipides pouvant fausser les mesures de potentiel sur les GUV. La validité de la technique pour mesurer le potentiel zêta des GUV sera discutée dans le chapitre III.

Les mesures de potentiel zêta sont répétées 3 fois sur chaque échantillon. Le potentiel zêta des GUV est mesuré sur les GUV dans leur solution de gonflement afin qu'elles ne sédimentent pas.

## II.F.4– Calorimétrie de titration isotherme (ITC)

La grande majorité des réactions chimiques est accompagnée d'un échange de chaleur Q. L'ITC mesure ce changement de chaleur afin de remonter à des valeurs thermodynamiques (**Pielak et al. 2001; Day et al. 2002**).

### *II.F.4.a – Principe de la mesure*

Les interactions entre une macromolécule et un ligand, dans notre cas entre l'ezrine et le PIP2, peuvent être d'un point de vue général décrites de la manière suivante :

$$Ez + nPiP_2 \Leftrightarrow (EzPiP_2)_n \qquad (24)$$

La liaison de l'ezrine au PIP2 peut être décrite avec une constante d'équilibre $K$ qui est déterminée par la relation *(24) :*

$$K = \frac{[(EzPiP_2)_n]}{[Ez][PiP_2]^n} = e^{-\Delta G\ /RT} \quad (25)$$

où $\Delta G$ est l'enthalpie libre de Gibbs. La constante de dissociation $K_d$ est égale à $1/K$ *(26)* (**Howard 2001**). L'énergie libre de Gibbs $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ *(27)* est reliée à la constante de dissociation de la réaction par la relation (*25*). $\Delta H$ est l'enthalpie de réaction.

La technique de microcalorimétrie nous permet de mesurer l'échange de chaleur Q produit par la réaction. La chaleur $Q$ est proportionnelle à l'enthalpie de liaison $\Delta H$ , au nombre de sites disponibles pour l'interaction $n$ ($n$ est la stœchiométrie), à la concentration du complexe $[(EzPiP_2)]$ et au volume de la cellule $V$ (**Lewis al. 2005**).

$$Q = n\Delta H\ [(EzPiP_2)]\,V \qquad (28)$$

La quantité de complexes $[(EzPiP_2)_n]$ formés est proportionnelle à la constante d'équilibre de la réaction et aux quantités totales d'ezrine et de PIP2 présents dans la solution. L'interaction impose que la quantité de complexes $[(EzPiP_2)_n]$ est égale à la quantité d'ezrine liée et à la quantité de *PIP2* lié. Nous avons donc $[(EzPiP_2)_n] = [ez]_{liée} = [PiP_2]_{lié}$. De plus les loi de conservation de la masse imposent $[PIP2]_{total} = [PIP2]_{lié} + [PIP2]_{libre}$ et pour l'ezrine avec $[ez]_{totale} = [ez]_{liée} + [ez]_{libre}$.

A l'aide de la formule (*25*) donnant la constante d'équilibre, nous exprimons $[(EzPiP_2)]$ en fonction de $K$, $[PIP2]_{total}$, $[ez]_{totale}$

$$2[EzPiP_2)] = ([ez]_{totale} + [PiP_2]_{total} + K_d) - (([ez]_{totale} + [PiP_2]_{total} + K_d)^2 - 4[ez]_{totale}[PiP_2]_{total})^{\frac{1}{2}}$$

Puis, nous injectons $[(EzPiP_2)_n]$ dans (27), il en découle l'équation *(29)* :

$$Q = \frac{1}{2} n\Delta H[ez]_{totale} V \left\{ 1 + \frac{[PiP_2]_{total}}{[ez]_{totale}} + \frac{1}{K.[ez]_{totale}} - ((1 + \frac{[PiP_2]_{total}}{[ez]_{totale}} + \frac{1}{K.[ez]_{totale}})^2 - 4.[PiP_2]_{total})^{\frac{1}{2}} \right\}$$

Lors d'une titration la chaleur dégagée par chaque injection est obtenue en mesurant l'aire sous les pics de changement de chaleur. Au fur et à mesure des injections, la quantité de protéines non complexées diminue. L'intensité des pics diminue jusqu'à saturation complète. Une fois la saturation atteinte, les injections produisent des pics d'égale intensité correspondant à de la dilution. Un exemple de titration est montré sur la figure II.F.6.

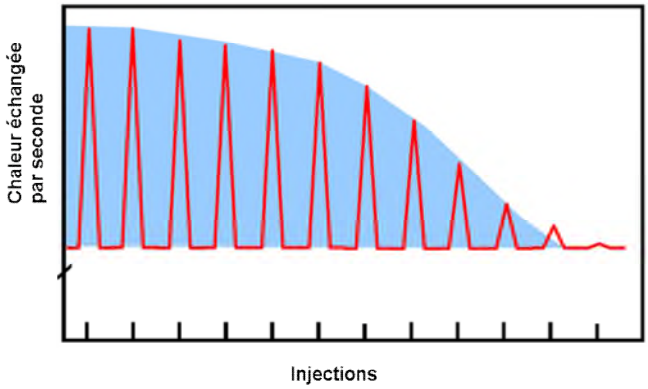



Fig II.F.6 : exemple de titration en microcalorimétrie. Chaque pic correspond à une injection de ligand.

Une courbe de titration est alors obtenue : en ordonnée est représentée la chaleur échangée et en abscisse est représenté le rapport $[PiP_2]_{total}/[ez]_{totale}$. Nous ajustons ensuite l'équation *(20)* sur notre courbe de titration. Nous en déduisons deux paramètres importants : la constante d'équilibre K (ou la constante de dissociation $K_d$), la stœchiométrie de la réaction *n*. Ensuite les équations *(25), (26)* permettent de calculer $\Delta G$. L'équation (*27*) permet ensuite *de* calculer la valeur de $\Delta S$ (**Lewis et al.2005**).

En utilisant l'équation *(29)* nous pouvons simuler des courbes de titrations et nous pouvons voir quels sont les effets de la stœchiométrie et de la constante de dissociation sur ces courbes. Le résultat de ces courbes simulées est montré sur la figure II.F.7. La courbe de titration est représentée en fonction du rapport $[PiP_2]_{total}/[ez]_{totale}$ correspondant à la stœchiométrie de la réaction. La forme de la courbe est dépendante de la constante d'affinité, plus le $K_d$ est petit et plus la courbe est abrupte.

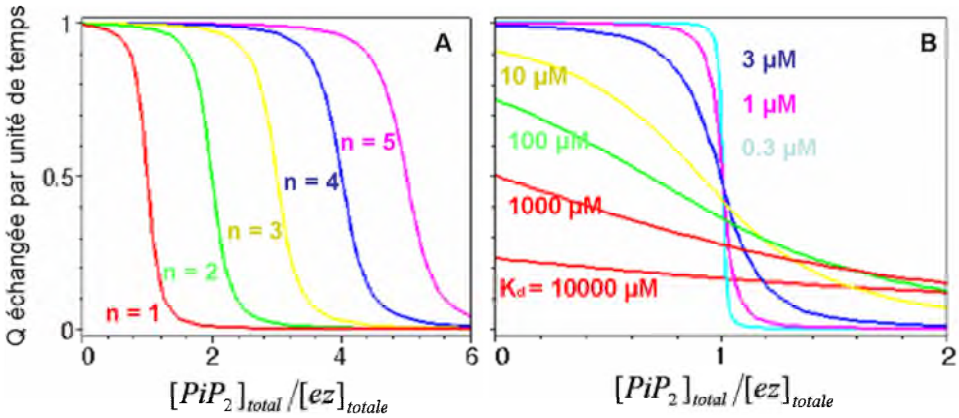



Fig II.F.7 : La chaleur échangée est représentée en fonction du rapport $[PiP_2]_{total}/[ez]_{totale}$. (A) Influence de la stœchiométrie sur la courbe de liaison et (B) influence du $K_d$ sur la courbe de liaison d'une réaction ayant une stœchiométrie de 1.

***II.F.4.b – Montage expérimental, préparation des échantillons et traitement des données***

Les expériences sont réalisées dans un microcalorimètre (*fig II.F.9*). Le calorimètre VP-ITC (Micro Cal, Northampton, MA) que nous utilisons opère en compensation de température, c'est-à-dire qu'il mesure l'énergie qu'il faut pour que la cellule contenant l'échantillon reste à température constante. Les mesures ont été faites au Centre de Biochimie Structurale (CBS) à Montpellier, avec l'aide de Stephan Arold et André Padilla.

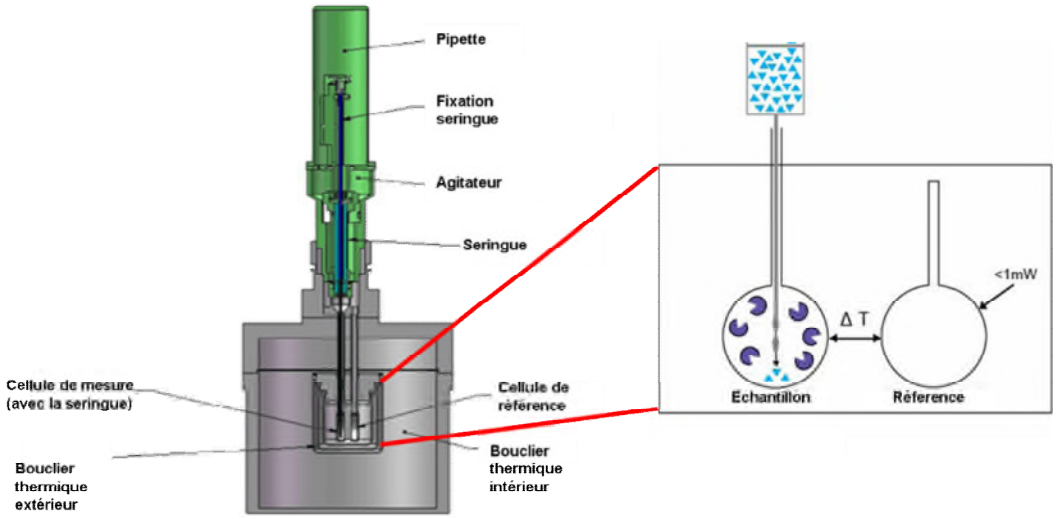



Fig II.F.9 : schéma d'un microcalorimètre.

Les solutions sont dégazées avant les expériences pour empêcher la formation de bulles qui gênent les mesures. Les titrations ont été effectuées à l'aide d'une seringue Hamilton contenant 350µl de PIP2 en solution dans l'eau à une concentration de 90µM. Les injections sont lancées après que l'appareil soit à une température stable de 25°C. L'expérience de titration consiste à faire 28 injections consécutives de 10µl de PIP2 dans une solution d'ezrine à 6.5µM ou de FERM à 3µM. Les injections durent 20s et sont espacées de 300s. Afin de corriger l'effet dû à la dilution, une expérience contrôle est réalisée dans laquelle le PIP2 est injecté dans du tampon. La cellule de mesure est sous agitation à 300 rpm pendant la titration. Deux ou trois titrations sont effectuées par condition expérimentale. Les données collectées ont été traitées avec un modèle d'interaction à un seul site à l'aide du logiciel Micro Cal ORIGIN fourni avec l'appareil.

# III – Résultats et discussions

## III.A – Interactions entre ezrine et PIP2 en solution

*In cellulo*, lorsque l'ezrine se localise à la membrane plasmique, elle se lie avec le PIP2 (**Niggli et al. 1995; Algrain et al. 1993**). Ensuite elle est phosphorylée (**Hayashi et al. 1999; Nakamura et al. 1999**) et enfin elle interagit avec l'actine.
*In vitro* la phosphorylation de l'ezrine est insuffisante pour qu'elle se lie à l'actine. La liaison au PIP2 parait déterminante pour l'activation de l'ezrine, c'est-à-dire pour que la protéine soit capable de ponter la membrane aux filaments d'actine (**Fievet et al. 2004**). La liaison au PIP2 a pour effet de fragiliser les interactions intramoléculaires de l'ezrine : le domaine C-terminal démasque le site d'interaction au PIP2 situé dans le domaine FERM.

### III.A.1 – Activation et changement conformationnel de l'ezrine

Afin de prouver que la liaison au PIP2 peut, à elle seule, induire un changement conformationnel de l'ezrine, nous allons utiliser la fluorescence intrinsèque des tryptophanes de la protéine et des expériences de calorimétrie. Dans les expériences, un rapport ω est défini. Le rapport représente les quantités relatives de PIP2 par rapport à la quantité d'ezrine, soit ω = [PIP2] / [Ezrine].

#### *III.A.1.a – Fluorescence intrinsèque du tryptophane*

La fluorescence intrinsèque du tryptophane est un outil de choix pour étudier le changement conformationnel d'une protéine. Les caractéristiques de l'émission de fluorescence du tryptophane, longueur d'onde et intensité, peuvent être modulées par son environnement (voir le chapitre II) (**Lakowicz 2006**). Les résidus tryptophanes de l'ezrine sont indiqués sur la figure III.A.1.

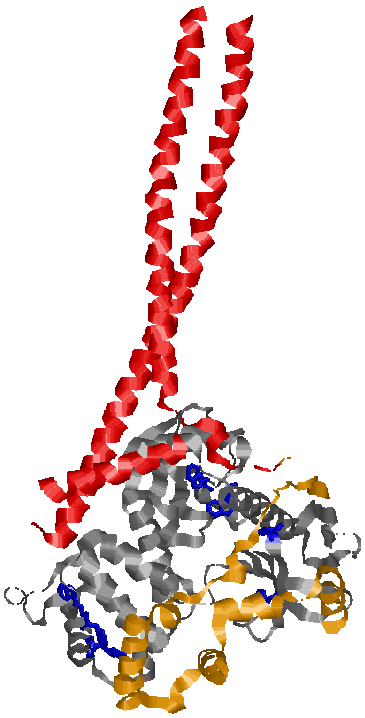


Fig III.A.1. Structure de l'ezrine, les tryptophanes sont en bleu, le domaine FERM est en gris, le domaine C-terminal en orange et l'hélice-α est en rouge.

L'ezrine possède 7 résidus tryptophanes : 6 résidus sont dans le domaine FERM et un seul résidu est dans l'hélice-α de la protéine.

*In vivo*, l'arrivée de l'ezrine à la membrane est associée à un changement dans l'interaction entre le domaine FERM et le domaine C-Terminal, ce qui a pour effet de permettre au domaine C-Terminal d'interagir avec l'actine (**Algrain et al. 1993; Roy et al. 1997**). Dans ce cas les tryptophanes dans le domaine FERM ne sont plus dans le même environnement. Une vision schématique est donnée dans la figure III.A.2.

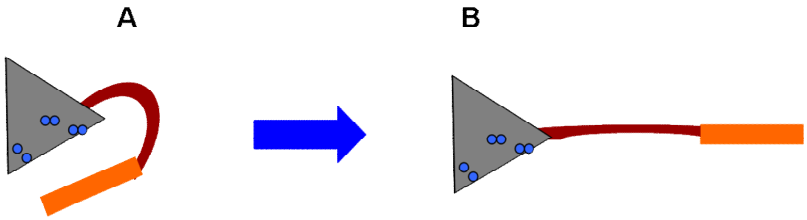



Fig III.A.2. Représentation schématique de l'ezrine. (A) En conformation fermée, le domaine C-terminal masque le domaine FERM. (B) En conformation ouverte, le domaine FERM est exposé, donc les tryptophanes sont également exposés au solvant. Il y a « ouverture de l'ezrine » ou « activation de l'ezrine ». Les points bleus représentent les tryptophanes, le triangle représente le domaine FERM et le rectangle le domaine C-Terminal.

Des spectres de fluorescence d'une solution contenant de l'ezrine WT à une concentration de 1 µM et des quantités variables de PIP2, et d'une solution contenant du domaine FERM à une concentration de 7.5 µM et des quantités variables de PIP2 sont mesurés. Dans les expériences, le rapport ω varie de 0 à 40 pour l'ezrine WT et de 0 à 5.4 pour le domaine FERM. Les spectres de fluorescence sont représentés sur la figure III.A.3. Les concentrations d'ezrine et de FERM ne sont pas égales car le FERM ayant les tryptophanes déjà exposés au solvant (absence du domaine C-Terminal), sa fluorescence intrinsèque est beaucoup plus basse que celle de l'ezrine où les tryptophanes sont masqués. Les concentrations choisies sont les concentrations pour lesquelles les signaux d'intensité de fluorescences sont comparables.

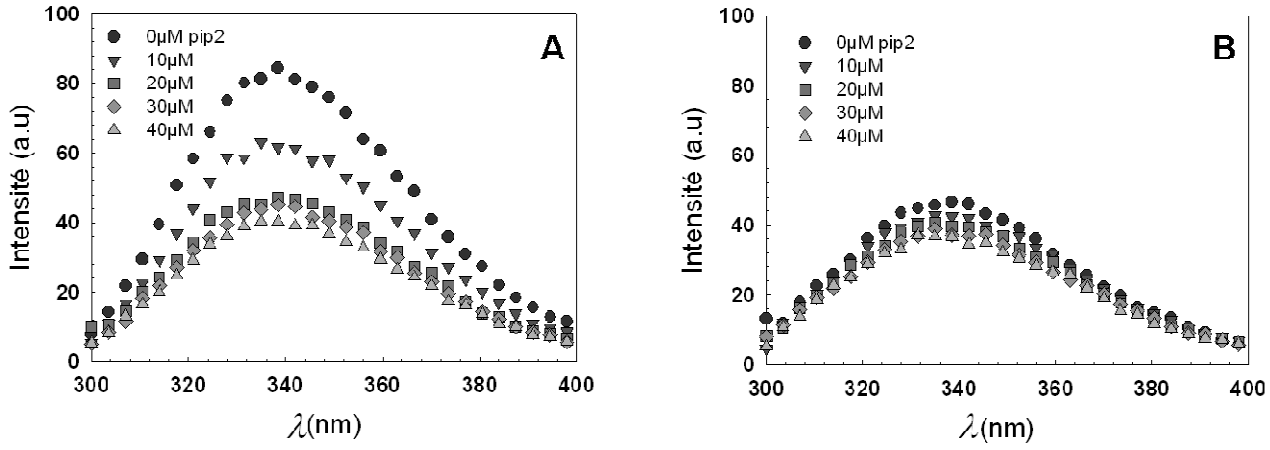



Fig III.A.3. (A) Spectres de fluorescence du tryptophane d'une solution d'ezrine WT à une concentration de 1 µM et en présence de quantités croissantes de PIP2 en solution. (B) Spectres de fluorescence du tryptophane pour une solution de domaine FERM à une concentration de 7.5 µM et en présence de quantités croissantes de PIP2. La diminution d'intensité montre une exposition des tryptophanes au solvant.

Lorsque des quantités croissantes de PIP2 sont ajoutées, on s'aperçoit que l'intensité de fluorescence décroit mais que la longueur d'onde d'émission maximale ne varie pas. Le même phénomène de décroissance de la fluorescence est observé avec le domaine FERM, mais dans une moindre mesure. Des expériences similaires ont été réalisées avec l'$IP_3$, la tête polaire du PIP2.

Afin de pouvoir comparer les différents échantillons entre eux, on définit le pourcentage de décroissance de la fluorescence comme le rapport de l'intensité de fluorescence du pic du spectre d'émission d'un échantillon en présence de PIP2 (ou de $IP_3$), sur l'intensité de fluorescence du pic du spectre d'émission du même échantillon en l'absence des inositides.

La figure III.A.4 représente le pourcentage de décroissance de fluorescence de l'ezrine WT et du domaine FERM en fonction de la concentration en PIP2 et $IP_3$.

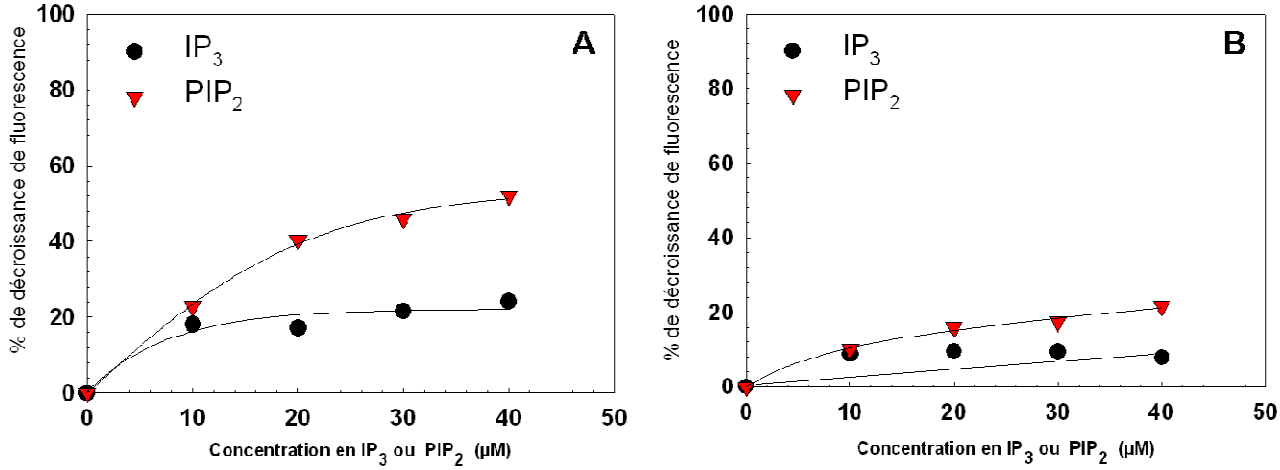



Fig III.A.4. (A) Pourcentage de décroissance de la fluorescence de l'ezrine WT en fonction de la concentration en PIP2 et en $IP_3$. (B) Pourcentage de décroissance de la fluorescence du domaine FERM fonction de la concentration en PIP2 et en $IP_3$. Les symboles sont les points expérimentaux et les traits pleins sont des guides pour l'oeil.

L'ajout de PIP2 à l'ezrine WT fait chuter la chuter la fluorescence de plus de 50 %. Lorsque du $IP_3$ est utilisé à la place du PIP2, nous observons également une chute de fluorescence de l'ezrine WT. Néanmoins l'effet de la tête $IP_3$ sur la fluorescence du tryptophane est beaucoup moins important que l'effet du PIP2, la chute de fluorescence étant au maximum de l'ordre de 20% seulement.

Le même phénomène est observé avec le domaine FERM, mais les chutes de fluorescence sont beaucoup plus petites que dans le cas de l'ezrine WT. L'ajout de PIP2 fait chuter la fluorescence de 18 % alors que l'ajout d'$IP_3$ la fait chuter de 10% environ.

Sur la base de la constante d'affinité mesurée précédemment (voir chapitre I), il est possible de calculer la quantité de protéine liée au PIP2 dans nos conditions. Dans ces expériences de fluorescence du tryptophane, nous avons entre 60 % d'ezrine liée (pour la concentration de PIP2 la plus basse) jusqu'à 90 % d'ezrine liée (pour la concentration de PIP2 la plus haute). Pour le domaine FERM, le pourcentage lié varie entre 15 % et 90 %. Même si les quantités d'ezrine et de domaine FERM ne sont pas les mêmes, le pourcentage de liaison est similaire.

Des expériences ont été également réalisées avec l'ezrine mutante 6N : cette ezrine n'est pas censée lier le PIP2 (**Barret et al. 2000**). Le spectre de fluorescence d'une solution d'ezrine 6N

à une concentration de 1µM est réalisé en présence de concentrations croissantes de PIP2 (*fig III.A.5*).

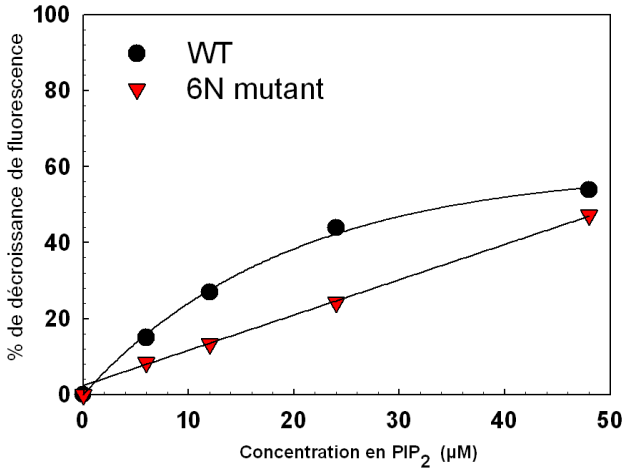



Fig III.A.5. Pourcentage de décroissance de la fluorescence de l'ezrine WT et de l'ezrine 6N en fonction de la concentration en PIP2.

Les décroissances d'intensité de l'ezrine WT et ezrine 6N ont un comportement similaire. Nous avons une décroissance maximale de 47 % avec le mutant 6N alors que nous avons une décroissance maximale de 53 % avec l'ezrine WT, ce qui montre clairement un effet du PIP2 sur l'ezrine mutée. L'ezrine mutée et l'ezrine WT interagissent toutes les deux avec le PIP2. Apparemment ce résultat est en contradiction avec les expériences réalisées *in cellulo* par Barret et collaborateurs (**Barret et al. 2000**).

***III.A.1.b – Calorimétrie isotherme à titration (ITC)***

Les quantités de chaleur mesurées en ITC permettent d'obtenir l'isotherme de liaison (voir chapitre II). Les interactions entre ezrine et PIP2 et entre FERM et PIP2 vont être étudiées.

Les titrations obtenues en microcalorimétrie sont montrées sur la figure III.A.7(A) pour l'ezrine et III.A.7(B) pour le FERM. La figure II.A.7 (A) représente l'enthalpie de liaison $\Delta H$ de l'interaction entre l'ezrine et le PIP2 obtenue en fonction du rapport molaire entre le nombre de moles de PIP2 présent dans la cellule de mesure, et le nombre de moles d'ezrine. Le graphe plus bas représente les chaleurs échangées lors de chaque injection de PIP2.

La réaction entre l'ezrine WT et le PIP2 est endothermique ($\Delta H \rangle 0$). De la même manière, la figure III.A.7(B) représente les caractéristiques de la titration entre le FERM et le PIP2. L'interaction entre le FERM et le PIP2 est exothermique ($\Delta H \langle 0$).

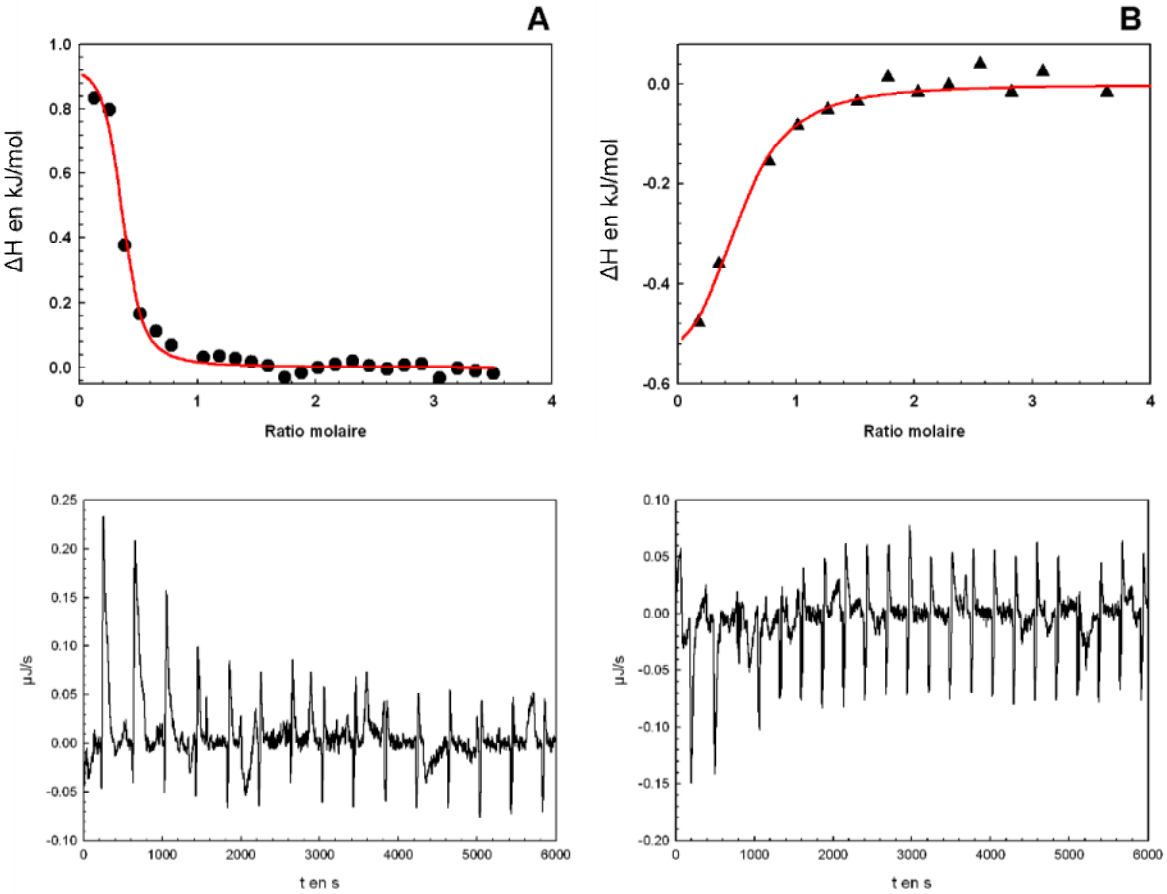



Fig III.A.7. (A) Courbe de titration de l'ezrine WT obtenue avec injection du PIP2 dans la cellule contenant l'ezrine. L'enthalpie de liaison est représentée en fonction du rapport molaire n(PIP2)/n (ezrine). Le trait plein est l'ajustement d'un modèle de liaison à un site. Les données brutes sont en dessous du graphe. La réaction est exothermique. (B) Courbe de titration du domaine FERM obtenue avec du PIP2. Les données brutes sont en dessous du graphe. Le trait plein est le l'ajustement d'un modèle de liaison à un site. La réaction est endothermique.

Les interactions du PIP2 avec de l'ezrine WT et avec du domaine FERM sont différentes :

- Ezrine WT interagissant avec PIP2

L'enthalpie de liaison $\Delta H$ est positive et la valeur moyenne sur 2 titrations est $\Delta H = (1674 \pm 1000)$ J/mol. La stœchiométrie moyenne de la réaction est $n = (0.83 \pm 0.7)$. L'entropie de liaison moyenne de la réaction est $\Delta S = (13.6 \pm 3.3)$ J/mol.K. L'enthalpie libre de la réaction est $\Delta G = (-2500 \pm 1000)$ J/mol. La constante d'affinité $K_d$ donnée par cette technique est entre 0.1 µM et 0.3 µM.

- FERM interagissant avec PIP2

L'enthalpie de liaison $\Delta H$ est positive et la valeur moyenne sur 2 titrations est $\Delta H = (-598 \pm 70)$ J/mol. La stœchiométrie moyenne de la réaction est $n = (0.45 \pm 0.1)$.

L'enthalpie libre de la réaction est $\Delta G = (-2177 \pm 562)$ J/mol. L'entropie de liaison moyenne de la réaction est $\Delta S = (5.3 \pm 0.8)$ J/mol.K. La constante d'affinité $K_d$ donnée par cette technique est entre 0.1 µM et 0.6 µM.

La liaison entre l'ezrine et le PIP2 ne présente pas les mêmes caractéristiques que l'interaction entre le domaine FERM et le PIP2 : il est intéressant de constater que l'une est exothermique alors que l'autre est endothermique. De plus l'entropie des réactions ne sont pas les mêmes. Dans le cas du domaine FERM, la réaction est exothermique et la composante entropique est faible, dans le cas de l'ezrine WT la réaction est endothermique et la contribution entropique est plus importante. La réaction exothermique entre le FERM et le PIP2 indique que l'énergie dégagée par la formation de liaisons FERM / PIP2 est supérieure à l'énergie requise pour effectivement former la liaison. La réaction endothermique entre l'ezrine et le PIP2 indique qu'il faut un apport d'énergie supplémentaire, par rapport à l'interaction FERM / PIP2, pour former la liaison ezrine / PIP2. Cette énergie supplémentaire nécessaire peut être du au démasquage du domaine FERM par la partie C-terminale. En effet, la liaison de l'ezrine au PIP2 puis le changement conformationnel, vont nécessiter un peu plus d'énergie qu'une interaction simple entre FERM et PIP2. De plus, le gain d'entropie observée avec l'ezrine WT peut également être interprété comme étant liée à un changement conformationnel (une « ouverture ») de la protéine : l'ezrine gagne en flexibilité.
Les constantes d'affinité mesurées avec cette technique soit environ dix fois plus faible que celles mesurées en précédemment par notre groupe (**Blin et al. 2008**). La différence peut être due à la sensibilité de la technique ou bien au système qui est différent, en ITC le PIP2 est en solution alors qu'il est dans une membrane de LUV lors de l'étude de Blin et collaborateurs. Il n'y a pas de différences d'affinité entre le FERM et l'ezrine.

### ***III.A.1.c – Expériences de sensibilité à la chymotrypsine***

Le changement conformationnel est vérifié également par des expériences de digestion de l'ezrine par la chymotrypsine qui ont été réalisées au laboratoire par Christian Roy (UMR 5235 – DIMNP).
La chymotrypsine est une protéase digestive de 24 kDa de la famille des sérineprotéase qui peut accomplir la protéolyse. On dit que c'est une protéase « à sérine » car elle fait appel à une sérine particulièrement réactive. Elle catalyse l'hydrolyse du lien peptidique d'une

protéine coupant sur le coté C-terminal des acides aminés à longues chaines latérales aromatiques ou hydrophobes (les phénylalanines, les tryptophanes et les tyrosines) (**Berg et al. 2002**).

La vitesse de dégradation de l'ezrine par la chymotrypsine va donner une indication sur sa conformation : si l'ezrine se dégrade très rapidement alors elle est dans une configuration non compacte où l'enzyme va pouvoir protéolyser rapidement. Au contraire, si la dégradation de l'ezrine prend plus de temps, elle est dans une conformation fermée (plus « compacte »), moins favorable à la protéolyse.

La figure III.A.8 montre des gels SDS de l'ezrine en contact avec la chymotrypsine suivie dans le temps.

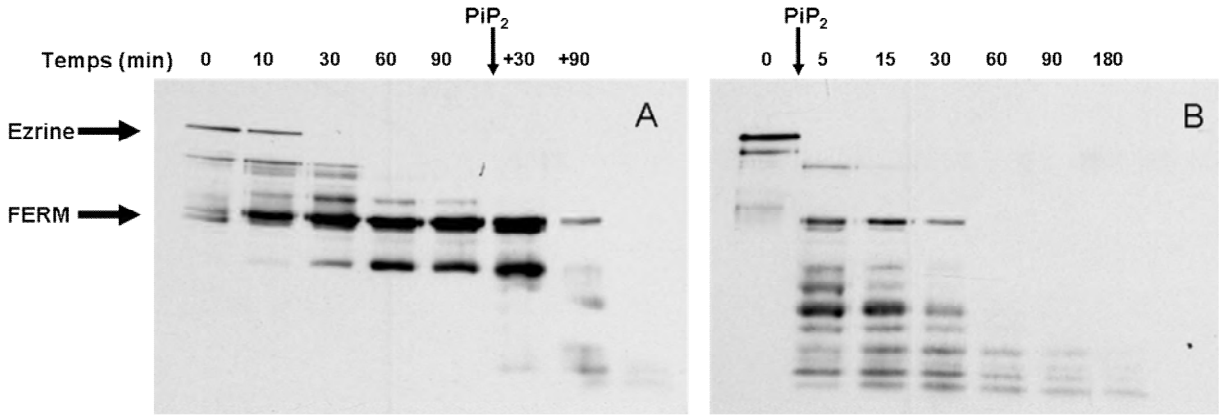



Fig III.A.8. Gels SDS-Page de l'ezrine en contact avec de la chymotrypsine. Du PIP2 est ajouté (A) 90 minutes après la chymotrypsine et (B) en même temps que la chymotrypsine.

Sans PIP2, l'ezrine entière est présente pendant 10 minutes dans le milieu. Ensuite seul persiste le domaine FERM. Lors de l'ajout du PIP2, le domaine FERM est lui aussi dégradé (*fig III.A.8 (A)*). Si le PIP2 est ajouté en même temps que la chymotrypsine dans le milieu, l'ezrine est complètement dégradée au bout de 5 minutes, et au bout de 90 minutes toute la protéine a été protéolysé (*fig III.A.8 (B)*). De même on peut comparer les temps de dégradation du FERM avec et sans PIP2. Sans PIP2, le domaine FERM est résistant à la dégradation par la chymotrypsine, en présence de PIP2, il est également dégradé.

### ***III.A.1.d – Discussion : le changement conformationnel***

C'est la première fois que le changement conformationnel de l'ezrine induit par le PIP2 est étudié *in vitro*. Trois points vont être discutés :

**i )** Effet du PIP2 sur l'ezrine

**ii )** Importance des chaines carbonées dans l'interaction

**iii )** Comportement du mutant ezrine 6N

**i)** Les expériences de fluorescence du tryptophane montrent que la fluorescence de l'ezrine WT décroit lors d'ajout de PIP2. Ainsi, des réarrangements structuraux interviennent, ce qui est compatible avec l'hypothèse que le domaine C-terminal démasque le domaine FERM en présence de PIP2. Lors de l'interaction entre ezrine et PIP2 les tryptophanes présents dans le domaine FERM sont plus exposés au solvant et donc leur fluorescence intrinsèque change. Cette observation est en accord avec une étude de Hamada et collaborateurs (**Hamada et al. 2000**) qui postule, sur la base de la structure des ERM, que la liaison au PIP2 peut induire un changement conformationnel capable de briser (ou d'affaiblir) les interactions entre le domaine C-terminal et le domaine FERM. Le passage de l'ezrine de sa forme fermée (interaction FERM avec C-terminal) à sa forme ouverte par la liaison au PIP2, est également confirmé par Fievet et collaborateurs (**Fievet et al. 2004**) qui montrent que la liaison au PIP2 est nécessaire à la phosphorylation. Nos expériences sont les premières preuves expérimentales que le PIP2 est suffisant pour induire un changement conformationnel de la protéine.

Lorsque du PIP2 est ajouté au domaine FERM, la décroissance de la fluorescence est beaucoup moins importante. En effet, le domaine FERM n'est pas masqué par la présence du domaine C-Terminal et donc les tryptophanes sont déjà exposés au solvant. Néanmoins l'existence d'une faible décroissance de la fluorescence en présence de PIP2 montre qu'il y a tout de même une réorganisation du domaine FERM. Ceci est en accord avec l'étude de Hamada (**Hamada et al. 2000**) qui montre qu'il est nécessaire d'avoir des réarrangements structuraux dans le domaine FERM afin que l'ezrine passe dans sa forme ouverte.

Les expériences d'ITC montrent que le domaine FERM et l'ezrine WT interagissent tous les deux avec le PIP2. Néanmoins une différence majeure apparaît. Dans le cas de l'ezrine WT, la réaction est exothermique : c'est l'entropie qui gouverne le processus. En revanche, dans le cas du FERM, la réaction est endothermique : c'est l'enthalpie qui domine.

Nous associons le gain d'entropie dans le cas de l'ezrine WT au changement conformationnel d'ouverture de la protéine. L'entropie du système est directement relié au nombre de configuration que celui-ci peut prendre. En effet si les interactions entre le domaine FERM et le domaine C-terminal sont abolies, alors la protéine « s'ouvre », elle va donc gagner en

flexibilité. Le domaine C-Terminal est relié au domaine FERM par une hélice-α flexible, ainsi il est possible pour l'ezrine d'avoir beaucoup plus de configurations spatiales que lorsqu'elle est fermée.

La sensibilité de l'ezrine à la chymotrypsine est augmentée en présence de PIP2. Ces expériences vont également dans le sens d'une « ouverture » de l'ezrine et donc d'une exposition à la chymotrypsine plus importante, d'où une dégradation par celle-ci plus rapide. De même, la sensibilité plus forte du FERM en présence de PIP2 montre un réarrangement structural du domaine FERM, en accord avec les expériences de fluorescence du tryptophane.

**Le PIP2 induit un changement conformationnel de l'ezrine et dans une moindre mesure du domaine FERM.**

**ii)** Jusqu'alors l'interaction entre l'ezrine et le PIP2 impliquait seulement le domaine FERM de l'ezrine et la tête phosphate du PIP2. Or, les expériences de fluorescence du tryptophane montre que pour de l'ezrine WT en contact avec le PIP2 une décroissance de fluorescence de plus de 50 % est observée, alors que dans les mêmes conditions, à peine 18 % de décroissance est observée avec l'$IP_3$. Dans le cas du FERM, c'est une décroissance de 20 % qui est observé avec le PIP2 et une décroissance de 8 % avec l'$IP_3$.
Les expériences de comparaison entre PIP2 et $IP_3$ suggèrent donc que les chaines carbonées sont importantes pour induire un changement conformationnel.
La figure III.A.9 montre le domaine FERM. Nous pensons qu'une des chaines carbonées peut venir interagir au niveau d'une poche riche en acides aminés hydrophobes que sont les tryptophanes et les phénylalanines.
Une étude de Saad et collaborateurs (**Saad et al. 2006**) montre, à l'aide de la résonance magnétique nucléaire (RMN) et des simulations de structures, qu'il est possible pour le PIP2 lorsqu'il est dans une membrane, d'interagir avec une protéine par les chaines hydrophobes. Ils montrent que la protéine HIV-1 MA peut se lier à la membrane via les phosphoinositides et qu'il est possible que les lipides adoptent une configuration « étendue » dans la membrane : une des chaines hydrophobes sort de la membrane pour interagir, *via* 4 carbones, avec un domaine hydrophobe dans la protéine. Une interaction de ce type pourrait expliquer les différences observées entre la liaison ezrine / PIP2 et ezrine / $IP_3$.

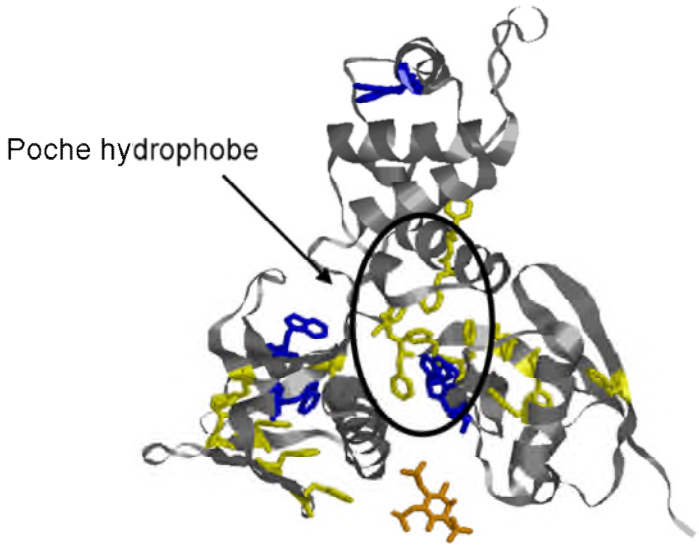



Fig III.A.9. Représentation du domaine FERM de l'ezrine. Le domaine FERM est en gris, les tryptophanes sont en bleu, les phénylalanines sont en jaune. L'$IP_3$ est en orange et il montre le site de liaison connu du PIP2. La flèche indique la poche hydrophobe.

**Nos expériences suggèrent que les chaines carbonées du PIP2 peuvent jouer un rôle lors de l'interaction entre ezrine et PIP2.**

**iii)** *In vitro*, le domaine FERM muté sur les mêmes résidus que l'ezrine 6N ne cosédimente pas avec des liposomes contenant du PIP2 (**Barret et al. 2000**). *In vivo*, l'ezrine 6N ne se localise pas à la membrane (**Barret et al. 2000**), ce qui suggérerait que le mutant n'interagit pas avec le PIP2. Or les expériences de fluorescence du tryptophane avec l'ezrine mutante 6N montrent que cette ezrine réagit comme l'ezrine WT.

**Le mutant ezrine 6N interagit avec le PIP2 en solution, alors qu'il n'interagit pas avec la membrane *in cellulo*.**

## III.A.2 – Formation de multimères d'ezrine en présence de PIP2

Il a déjà été montré que l'ezrine est capable de former des oligomères *in vivo* (**Berryman et al. 1995; Bretscher et al. 1995; Chambers et al. 2005; Gautreau et al. 2000**). Cette oligomérisation a souvent été associée à la phosphorylation de l'ezrine. Cependant le rôle du PIP2 dans la formation d'oligomères d'ezrine n'a jamais été étudiée.

Dans cette partie, nous allons montrer qu'il existe des oligomères d'ezrine qui se forment lors de l'interaction avec PIP2.

### ***III.A.2.a – Expériences de Western Blot***

Des expériences de Western Blot ont été réalisées afin d'identifier les conditions dans lesquelles il se forme des oligomères d'ezrine.

Un agent réticulant est utilisé en présence d'ezrine. Le DSP (Dithiobis-succinimidyl-propionate) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) est un réticulant homobifonctionnnel clivable en milieu réducteur. Le réticulant a une taille équivalente à une chaine de quatre carbones (1 nm), il ponte les amines entre elles. Lorsque deux protéines sont en interaction, le DSP va lier les deux protéines.

Les expériences ont été effectuées avec des concentrations variables en PIP2 (0, 10 et 30 µM) et une concentration constante d'ezrine de 3 µM. Le rapport $\omega$ = [PIP2] / [Ezrine] varie donc de 0 à 10. La coloration des membranes à l'aide du bleu de Comassie permet de détecter toutes les espèces protéiques.

Les membranes colorées avec le bleu de Comassie ne révèlent pas la présence de multimères d'ezrine en absence de DSP (*fig III.A.10*). En présence de DSP, il apparaît, de légères bandes aux alentours de 200 kDa. En présence de PIP2 le marquage à l'aide d'anticorps spécifiques en Western Blot semble confirmer les observations faites avec la coloration en bleu (*fig III.A.11*).

La figure III.A.11 montre qu'en absence de PIP2, l'ezrine migre à un poids moléculaire de 80 kDa. De plus aucune espèce de poids moléculaires supérieur à 80 kDa n'est détectée. Lorsque du PIP2 est ajouté, des bandes apparaissent autour de 120kDa : il existe donc des espèces plus lourdes que l'ezrine WT.

Lorsque le DSP se fixe sur les protéines, leurs tailles apparentes varient légèrement (suivant le nombre de molécules de DSP qui se fixent sur celles-ci). Dans ces conditions l'ezrine acquière une distribution de taille plus large, c'est pourquoi les bandes en présence de DSP sont plus larges qu'en absence de DSP. En présence de DSP des oligomères sont plus visibles qu'en absence de DSP : il apparaît des bandes presque continues entre 120kDa et 200kDa en présence de PIP2. Sans PIP2, en revanche, aucune espèce de plus haut poids moléculaire que l'ezrine n'est détectée.

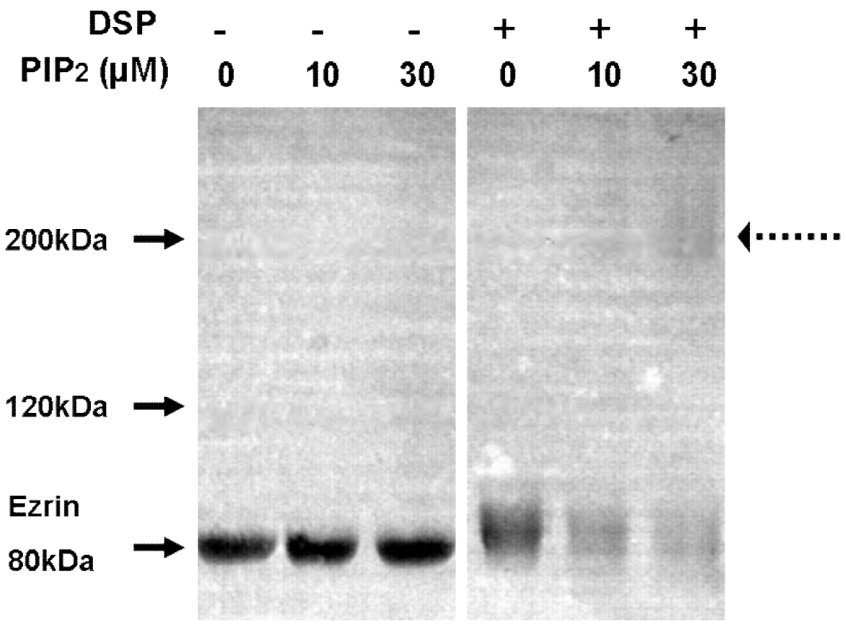



Fig III.A.10. Coloration au bleu de Comassie. Sans DSP, seule l'ezrine est visible à 80 kDa. En présence de DSP, de légères bandes apparaissent aux alentours de 200 kDa.

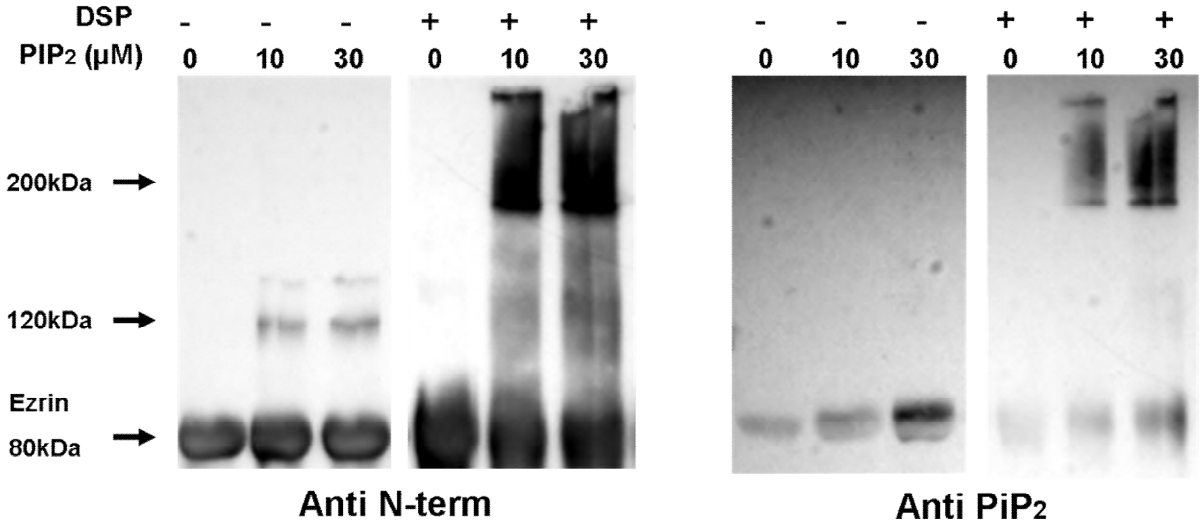



Fig III.A.11. Observation de l'ezrine WT à l'aide des anticorps anti-N-terminal dirigés contre l'ezrine et à l'aide des anticorps anti-PIP2. En présence de PIP2, il existe des espèces plus lourdes que l'ezrine. Les anticorps anti-PIP2 montrent la présence de PIP2.

Le plus surprenant est de voir sur la figure III.A.11 (B) les résultats obtenus avec l'anticorps anti-PIP2 qui montrent la présence de PIP2 à un poids moléculaire égal à celui de l'ezrine et égal à celui des oligomères d'ezrine. Ceci montre que l'interaction que l'interaction entre l'ezrine et le PIP2 a résisté au gel dénaturant de SDS-Page.

Une expérience similaire est réalisée avec de l'ezrine 6N. Cette fois-ci la coloration de la membrane par le bleu de Comassie ne révèle pas de bande de haut poids moléculaire, que ce soit avec ou sans DSP (*fig III.A.12*). Le marquage en Western Blot, montré sur la figure III.A.13 confirme qu'il n'y a pas de formation d'espèces plus lourdes que l'ezrine.

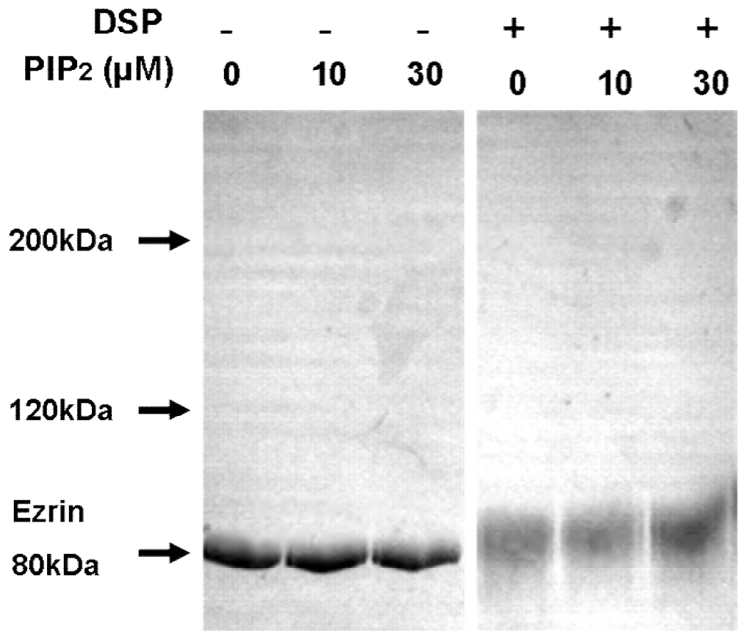



Fig III.A.12. Coloration des membranes avec le bleu de Comassie lorsque l'expérience est réalisée avec de l'ezrine mutante 6N.

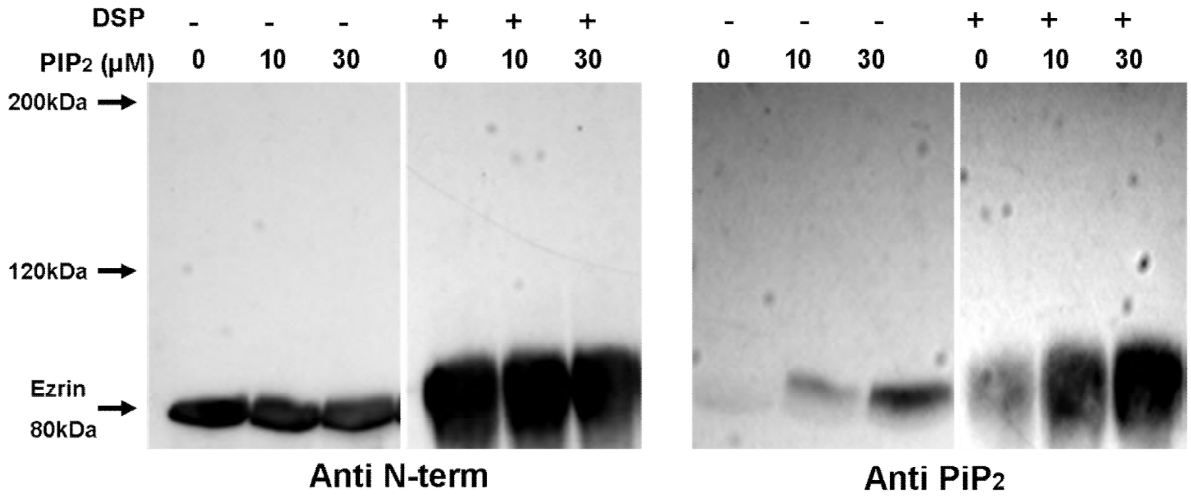



Fig III.A.13. Observation de l'ezrine 6N à l'aide des anticorps anti-N-terminal en absence de DSP et en présence de DSP. Les anticorps anti- PIP2 montrent qu'il existe une interaction ezrine 6N / PIP2 et que cette interaction est résistante au gel SDS-page en absence de DSP et en présence de DSP.

Le marquage à l'aide d'un anticorps anti-PIP2 révèle que le PIP2 est situé au même niveau de la bande d'ezrine. L'interaction entre ezrine 6N et PIP2 est résistante au gel SDS-Page également.

Dans les expériences précédentes, le PIP2 est en solution dans le milieu. Or, *in cellulo*, le PIP2 est dans une membrane. Aussi dans le but de voir si les interactions entre l'ezrine et le PIP2 peuvent être modifiées lorsque celui-ci est dans une membrane, nous réalisons des expériences avec des LUV contenant du PIP2. Dans la figure III.A.14, l'ezrine est incubée avec des LUV contenant du PIP2 à hauteur de 5 % ou 10 % en masse avec des concentrations de 2 mg/ml et 1 mg/ml. Puis, la solution est centrifugée afin de récupérer les LUV dans le culot. Les culots et les surnageant sont déposés sur gel.

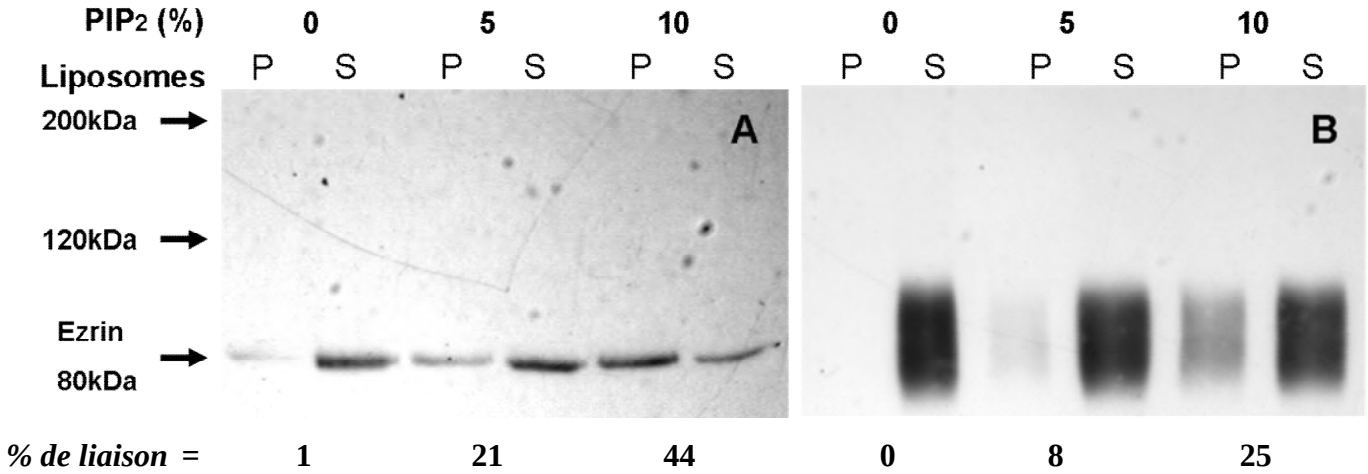



Fig III.A.14. P représente le culot et S représente le surnageant. Observation des anticorps anti-N-terminal sur les membranes des Blot. Il n'y a pas de multimères d'ezrine WT détectables, (A) en absence de DSP ou (B) en présence de DSP. Il n'y a aucun marquage détectable avec les anticorps anti-PIP2 (non montré). Le pourcentage de liaion de l'ezrine représente la quantité relative d'ezrine qui a cosédimentée avec les LUV.

Après centrifugation du mélange contenant des LUV incubées dans une solution d'ezrine, deux cas de figure peuvent être envisagés :

- Si les LUV n'ont pas interagi avec l'ezrine, l'ezrine sera uniquement dans le surnageant.
- Si les LUV ont interagi avec l'ezrine, une partie de la protéine sera dans le culot (car elle aura sédimentée avec les LUV).

Le pourcentage d'ezrine liée est calculé en mesurant l'intensité de la bande correspondante au culot et l'intensité de la bande correspondante au surnageant. En présence de quantités

croissantes de PIP2 dans les LUV, on s'aperçoit que le pourcentage d'ezrine liée augmente, c'est-à-dire que la quantité d'ezrine en interaction avec les LUV augmente.
En revanche, contrairement à ce qui est observé avec du PIP2 en solution, le marquage à l'aide d'anticorps anti PIP2 n'est pas localisé au poids moléculaire de l'ezrine. Donc l'interaction entre le PIP2 et l'ezrine n'est pas résistante au gel SDS-Page lorsque le PIP2 est inséré dans une membrane de LUV.
D'autre part, il n'existe pas d'espèces ayant des poids moléculaires plus haut que celui de l'ezrine. Il n'y a pas de formation de multimères lorsque le PIP2 est dans la membrane des LUV.

On note que dans ces expériences de Western Blot, les effets du PIP2 sont observés dans des conditions dénaturantes pour les proteines. Afin de vérifier que le phénomène d'oligomérisation existe aussi dans des conditions natives, nous avons suivi la formation de ces oligomères par diffusion de lumière.

### ***III.A.2.b – Expériences de diffusion de lumière statique et dynamique***

La diffusion dynamique permet de mesurer la taille de particules en suspension. Nous allons utiliser cette technique afin de mesurer le rayon de l'ezrine WT et d'observer, dans des conditions non dénaturantes, comment évolue la distribution de taille de la protéine en présence de concentrations croissantes de PIP2.
Le montage expérimental décrit dans le chapitre II ne permet pas de travailler avec des échantillons de basses concentrations, c'est-à-dire inférieures à 100 µg / ml. La concentration minimale pour laquelle le signal d'intensité diffusée par la solution de protéines est deux ou trois fois supérieur au bruit de fond est de l'ordre de 300 µg / ml. Afin d'avoir un signal correct pour une durée de mesure de 20 minutes, nous avons choisi d'utiliser des échantillons d'ezrine à une concentration de 12.5 µM, soit environ 800 µg / ml et d'un volume de 1.2ml. Ces expériences nécessitent une grande quantité d'ezrine (une purification pour une gamme d'expériences), aussi les expériences sont effectuées avec le même échantillon de protéine auquel il est ajouté des quantités croissantes de PIP2 à l'aide d'une micropipette. Le rapport $\omega$ = [PIP2] / [Ezrine] varie donc de 0 à 3.2.

Nous montrons sur la figure III.A.15 la fonction de corrélation obtenue pour une solution d'ezrine de concentration de 12.5 µM à un angle de diffusion de 90°. La fonction de

corrélation est une mono exponentielle décroissante caractérisée par un seul temps caractéristique τ. Nous vérifions que le temps caractéristique τ est inversement proportionnel au carré du vecteur de diffusion, $q^2$. De la pente de la droite obtenue, le diamètre hydrodynamique $D_H$ de la protéine (*fig III.A.15(B)*) est calculé. On trouve $D_H$ = (8.4 ± 0.2) nm, en accord avec les dimensions déduites de la structure des protéines ERM (**Hamada et al. 2000; Li et al. 2007**).

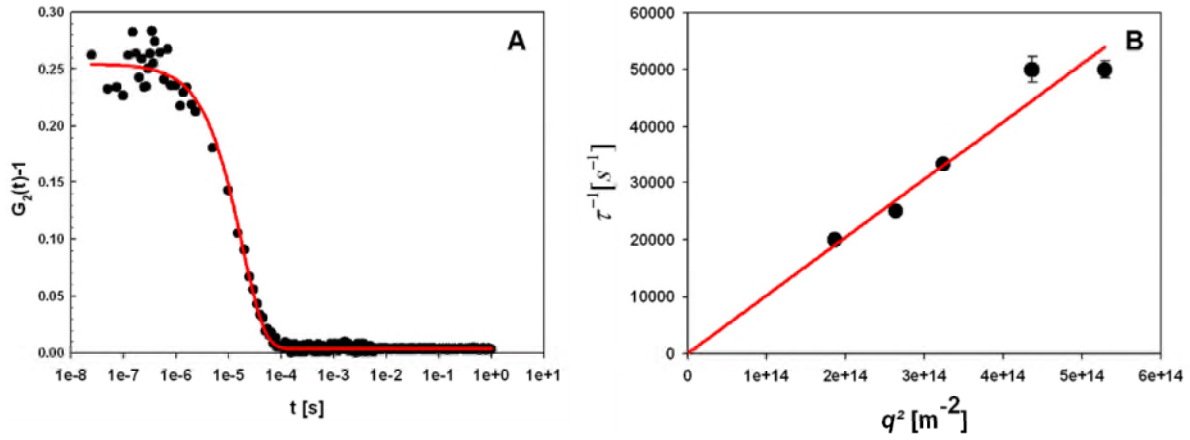



Fig III.A.15. (A) fonction de corrélation d'une solution d'ezrine à une concentration de 12.5 µM pour un angle de diffusion de 90°. Le trait plein correspond à une loi monoexponentielle de décroissance. (B) Inverse du temps caractéristique en fonction de $q^2$. Nous avons bien une loi linéaire. Le diamètre $D_H$ déduit de la pente de la droite est $D_H$ = (8.4 ± 0.2) nm.

En présence de PIP2, la fonction de corrélation se décale vers des temps caractéristiques plus longs comme montré sur la figure III.A.16. De plus il n'est pas possible d'ajuster de manière satisfaisante la fonction de corrélation avec une loi en monoexponentielle, ni même avec une somme de deux exponentielles. La fonction de corrélation indique l'existence de plusieurs temps caractéristiques et donc la présence d'espèces de différentes tailles en solution.

Les différentes fonctions de corrélation sont analysées à l'aide du logiciel BIC-DLS software. L'analyse est faite en utilisant l'algorithme NNLS (**Morrison et al. 1985**) qui décompose les fonctions de corrélation en somme d'exponentielles. La figure III.B.14 montre des distributions de taille de l'ezrine WT seule ou d'ezrine WT en contact avec du PIP2 en solution. En absence de PIP2, la distribution est unimodale (*fig III.A.17 (A)*), avec un diamètre de (8.5 ± 2) nm, ce qui est en parfait accord avec l'analyse faite en monoexponentielle de la figure III.A.15.

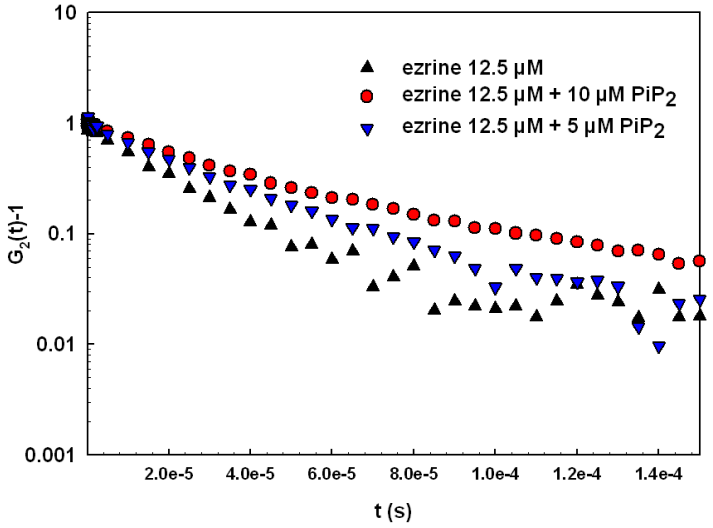



Fig III.A.16. Fonction de corrélation pour une solution contenant de l'ezrine WT à une concentration de 12.5 µM et des concentrations variables de PIP2, 0 , 5 et 10 µM. Le décalage vers les temps plus longs en présence de PIP2 indique qu'il y a des particules plus grandes que l'ezrine WT en solution.

La figure III.A.17 de (A) à (E) représentent les distributions de tailles pour une solution d'ezrine à une concentration de 12.5 µM en présence de quantités variables de PIP2. Les distributions sont bimodales pour les concentrations de PIP2 de 5 µM et 10 µM, avec des pics centrés autour de 9 nm et 15 nm. Pour les concentrations en PIP2 de 20 µM et 40 µM, il apparaît de très grosses espèces en solution, au delà de 150 nm, et des très petites, au dessous de 2 nm, les distributions de taille ne sont plus bimodales. Pour les figures III.A.17 (D) et (E), les distributions tailles ne sont représentées que jusqu'à 35 nm. Lorsque du PIP2 est dissous à hauteur de 40 µM dans le tampon, il n'apparait rien en diffusion dynamique, la fonction de corrélation est plate.

L'acquisition est faite à 25°C et l'échantillon de protéine reste plusieurs heures à cette température. Il est possible qu'au bout d'un certains temps une partie de la protéine se dénature. Au bout de quelques heures d'expériences, il apparaît, même pour des angles de diffusion entre 60° et 100°, des petites espèces (≈ 1 nm), ainsi que des espèces très grosses (≈ 150 nm). Ces espèces sont associées à des produits de dégradations (agrégation non spécifique des produits de dégradation) ou à des petites impuretés introduites lorsqu'il y a l'ajout du PIP2. Le tampon contenant le PIP2 n'a pas d'impuretés mais des poussières peuvent tout de même être introduites malgré les précautions (poussières et impuretés dans l'air, sur les cônes des pipettes etc…). C'est pourquoi lors de l'analyse des résultats, les

petites espèces de 1 nm ou de 150 nm n'ont pas été prises en comptes dans les distributions de tailles.

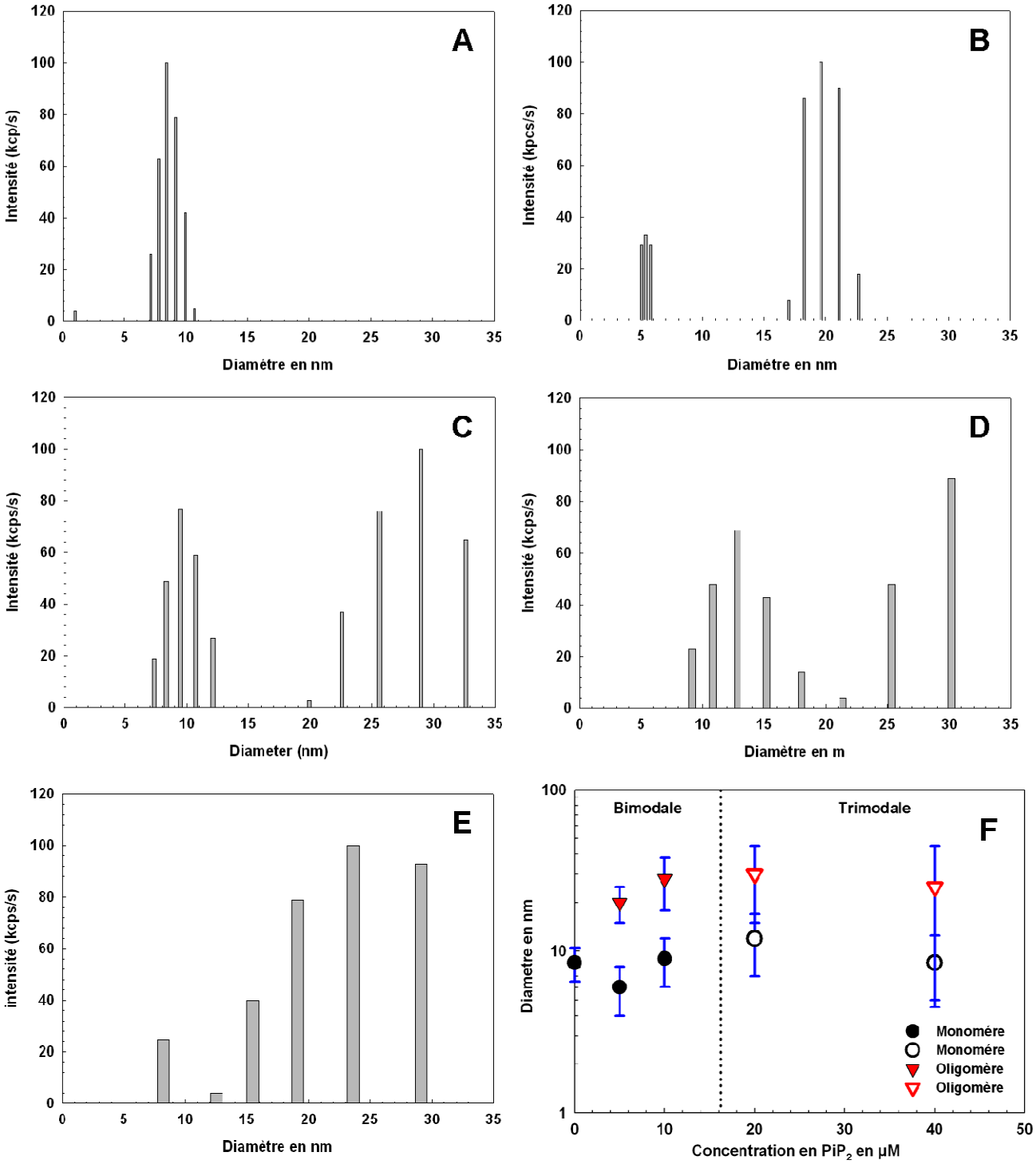



Fig III.A.17. Distribution de taille pour des échantillons à concentration constante en ezrine (12.5 µM) et à concentration variable en PIP2 (A) 0 µM, (B) 5 µM, (C) 10 µM , (D) 20 µM, (E) 40 µM. (F) Taille des différentes espèces en fonction de la concentration de PIP2, déduite des distributions montrées en (A)-(E). La ligne en pointillés sépare les distributions bimodales des distributions trimodales.

Sur la figure III.A.17 (F) le diamètre des espèces en solution en fonction de la quantité de PIP2 est représenté. Le centre des pics qui apparaissent sur la distribution des diamètres est pris comme diamètre des espèces, et la largeur à mi-hauteur comme barres d'erreur. Sans PIP2, la distribution est unimodale avec un pic autour de 8 nm correspondant à l'ezrine. Dès l'ajout de PIP2, une seconde espèce apparaît à 15 nm, mais le pic autour de 8 nm est toujours présent. Lorsque des quantités croissantes de PIP2 sont ajoutées, la seconde espèce se stabilise à un diamètre aux alentours de 30 nm à partir d'une concentration en PIP2 de 20 µM.

Les distributions de taille ont été mesurées pour une gamme d'angle de diffusion variant de 50° à 110°. Les distributions de taille sont indépendantes de l'angle de diffusion entre 60° et 100°. Au dessous de 60° et au dessus de 100°, des impuretés présentes dans la solution prédominent et celles-ci faussent quelque peu les mesures.

Afin de quantifier la quantité d'oligomères en solution, nous utilisons la diffusion statique de la lumière.
Les rapports de l'intensité diffusée sur l'intensité de référence (intensité de l'ezrine seule) sont représentés sur la figure III.A.18 (voir chapitre II). L'intensité diffusée par l'échantillon est indépendante de q, sauf pour les concentrations les plus importantes de PIP2. Les deux concentrations les plus faibles (5µM et 10 µM de PIP2) sont chronologiquement les premières mesures après les mesures avec l'ezrine seule, et donc celles qui contiennent le moins d'impuretés. Aussi, à cause des problèmes de dégradation de l'ezrine et à la possible introduction d'impuretés, les analyses ne seront faites que sur les deux plus faibles concentrations de PIP2, ce qui correspond, en diffusion dynamique, à des distributions de taille bimodales.
L'intensité diffusée augmente lors de l'ajout de PIP2 dans la solution contenant la protéine. Cette augmentation d'intensité est due à la présence d'espèces plus lourdes que l'ezrine
Les intensités avec les concentrations de 20 µM et de 40µM de PIP2 ne sont plus plates à petits angle de diffusion. C'est en accord avec la diffusion dynamique qui montre des espèces de l'ordre de 150 nm en solution. La diffusion statique permettra de déduire le nombre relatif d'oligomères, ainsi que leur géométrie.

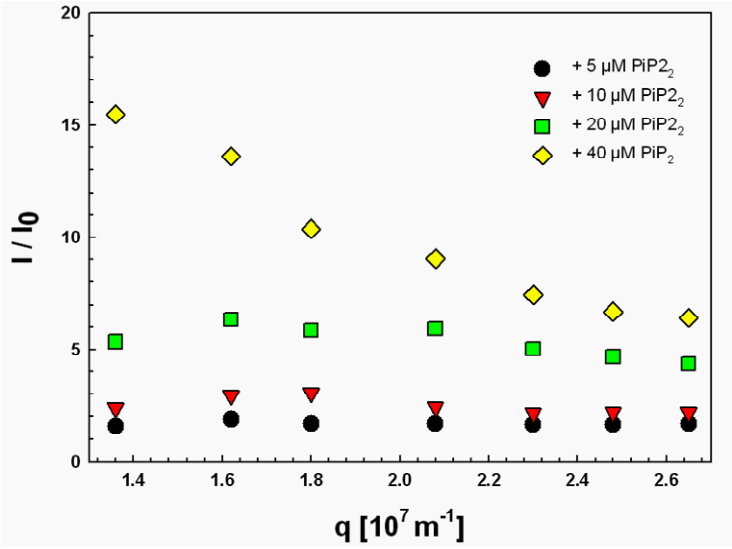



Fig III.A.18. Rapport de l'intensité diffusée par une solution d'ezrine à 12.5 µM contenant des quantité variables de PIP2 (*I*) sur l'intensité diffusée par d'une solution d'ezrine à 12.5 µM sans PIP2 ($I_0$), en fonction du vecteur d'onde.

### ***III.A.2.c – Discussion : formation des multimères et irréversibilité de la liaison ezrine / PIP2.***

Les expériences de Western Blot et de diffusion de lumière montrent la formation d'agrégats de protéines en présence de PIP2. Nous discuterons sur :

**i)** L'irréversibilité de l'interaction entre ezrine et PIP2.

**ii)** Les conditions de formation des oligomères d'ezrine.

**iii)** L'évaluation de la quantité d'oligomères.

**iv)** Différents modèles d'oligomérisation.

**i)** Les Western Blot montrent que l'interaction entre ezrine et PIP2 en solution est résistante au gel SDS-Page : les protéines sont bouillies en présence de SDS (conditions dénaturantes). Les résultats obtenus avec les expériences de Western Blot peuvent être en accord avec les expériences précédemment obtenues avec la fluorescence du tryptophane. Si une des chaines du PIP2 interagit avec la poche hydrophobe située dans le domaine FERM, on peut éventuellement s'attendre à ce que l'interaction soit résistante au gel SDS-Page, ainsi cette vision de l'interaction peut expliquer pourquoi le pourcentage de décroissance de la fluorescence du tryptophane est aussi plus important avec le PIP2 plutôt qu'avec l'$IP_3$. *A contrario* l'interaction entre l'ezrine WT et la membrane d'une LUV contenant du PIP2 n'est

pas résistante au gel SDS-PAGE. En effet, il est possible que dans ce cas précis les chaines ne puissent pas intervenir dans l'interaction.

**ii)** Des oligomères d'ezrine sont détectés seulement en présence de PIP2. Les poids des oligomères sont déduits des Western Blot. La présence d'un réticulant (le DSP) semble stabiliser les oligomères. Nous observons, en présence de DSP, une bande large à 200kDa, mais nous observons également, sans DSP, une bande à 120kDa. Nous pensons que la bande à 120kDa correspond au dimère alors que la bande à 200kDa correspond a un trimère. L'ezrine migre à une hauteur de 81kD alors que son poids est de 69kDa, il est possible que la conformation des oligomères les fasse paraître à un poids légèrement décalé de leurs poids réels. La hauteur de notre bande correspond bien à un poids attendu pour le dimère, c'est-à-dire aux alentours de 120kDa - 140kDa. De la même manière, pour le trimère, il ne serait pas étonnant qu'il apparaisse à une hauteur correspondant à un poids d'environ 200 kDa.
Néanmoins le réticulant (DSP) semble favoriser la formation de trimères plutôt que celui de dimères. La méthode de réticulation par le DSP a déjà été utilisée afin de voir la présence de multimères d'ezrine purifiée de placenta (**Berryman et al. 1995**). Dans l'étude de Berryman, deux bandes sont visible en présence de DSP : l'une située à 81 kDa correspondant à l'ezrine, et l'autre aux alentours de 200kDa qu'ils considèrent comme le dimère d'ezrine.

En DLS les distributions de taille révèlent les monomères d'ezrine à un diamètre de 9 nm et les oligomères situés à des diamètres entre 15 nm et 30 nm. Les espèces plus grosses que l'ezrine monomériques apparaissent seulement en présence de PIP2.

**iii)** La quantification de la quantité d'oligomères présent dans les solutions ne peuvent pas être déduits des expériences de Western Blot, ni des marquages en bleu de Comassie.
En effet, les marquages des membranes en bleu de Comassie ne révèlent pas les bandes correspondant aux oligomères, sauf en présence de DSP. Mais la présence de DSP peut déplacer l'équilibre de la réaction et donc la quantité d'oligomères obtenus ne serait pas en accord avec le nombre de multimères présents avant l'ajout du réticulant.
Les expériences de Western Blot ne peuvent donner de quantification dans notre cas. En effet, afin de pouvoir observer des bandes de hauts poids moléculaires le temps d'exposition en photoluminescence a du être allongé. Les bandes d'ezrine monomériques sont saturées, rendant impossible la mesure de l'intensité de celles-ci et rendant donc impossible la

comparaison avec les bandes correspondantes aux oligomères. De plus, il est possible que les anticorps ne marquent pas toutes les protéines sur la membrane. En effet, si dans les oligomères, l'épitote n'est pas, ou peu accessible à l'anticorps, il est possible que le marquage ne reflète pas la quantité d'oligomères réellement présents.

Le rapport de la quantité d'oligomères sur la quantité de monomères est déduit de la diffusion statique de la lumière. Nous posons *n* : nombre de monomères, *m* : masse des monomères, *N* : nombre de multimères, *M* : masse des multimères. En reprenant les équations du chapitre II, nous avons $I_0 \propto n_0.m^2$ en présence de monomères seulement, et nous avons $I \propto (n.m^2 + N.M^2)$ en présence de monomères et d'oligomères.

Le calcul de $I/I_0$ donne $I/I_0 = \frac{nm^2 + NM^2}{n_0 m^2}$. La conservation de la masse impose $n_0.m = nm + N.M$. On pose le rapport des masses $a = M/m$, le rapport de la quantité de d'oligomères sur la quantité de monomères $y = N/n$ et le rapport de l'intensité diffusée sur l'intensité de référence $\chi = I / I_0$. Le rapport $\chi$ est mesuré en diffusion statique.

*y* peut être exprimé en fonction de *a* et $\chi$ : $y = \frac{\chi - 1}{a(a - \chi)}$.

La quantité d'oligomères peut être évalué en discutant sur le rapport des masses *a*. Le rapport de la quantité d'oligomères sur la quantité de monomères peut être évalué de différentes manières : en posant le rapport le rapport des masses (dimères *a* = 2, des trimères *a* = 3 et des tétramères *a* = 4) ou en utilisant les données de DLS pour déduire le rapport des masses en fonction de la géométrie de l'agrégat et de la taille de celui-ci.

Lorsque nous posons le rapport des masses *a*, il est possible de calculer la valeur de *y* : le tableau III.A synthétise les différents valeurs de *y* en fonction de *a*.

| **[PIP2]** | **ω** | **$\chi$ = I / $I_0$** | **a = 2** | **a = 3** | **a = 4** |
|---|---|---|---|---|---|
| **5 µM** | **0.4** | **1.6** | *75 %* | *14 %* | *6 %* |
| **10 µM** | **0.8** | **2.2** | -- | *50 %* | *16 %* |

Tableau III.A. Quantité relative d'oligomères en fonction du rapport massique *a*. Lorsqu'aucune valeur n'est inscrite cela dénote une incohérence (supérieure à 100% par exemple).

Les rapports massiques donnent une quantité de multimères non négligeables. Vraisemblablement, la réalité est un mélange de plusieurs espèces (dimères, trimères etc…).

On peut également évaluer le rapport massique *a* à partir des tailles mesurées en diffusion de lumière. Le tableau III.B donne les tailles moyennes mesurées en diffusion.

| **ω= [PIP2] / [Ezrine]** | ***d*** (diamètre monomère) | ***D*** (diamètre multimère) |
|---|---|---|
| **0.4** | *7.4 nm* | *20 nm* |
| **0.8** | *7.4 nm* | *28 nm* |

Tableau III.B. Tailles moyennes mesurées en DLS des différentes espèces en solution.

En effet, le rapport massique dépend également de la morphologie des oligomères. Le rapport massique $a = M/m = (D/d)^{df}$ avec *D* la taille moyenne des multimères, et *d* la taille moyenne du monomère, toutes deux déduites des distribution de taille données par la DLS. La dimension fractale *df* reflète la morphologie de l'agrégat. La figure III.A.19 montre, d'une manière schématique, les différentes morphologies possibles. *df* est variée de 1 (association sous forme de chaines unidimensionnelles) à 3 (association des monomères sous une forme compacte sphérique). A partir des tailles, nous calculons la valeur du rapport *y* et de la dimension fractale *df* de l'oligomère. Le tableau III.C montre les différentes valeurs obtenues.

| **[PIP2]** | **ω** | **$\chi = I / I_0$** | ***df* = 1** | ***df* = 2** | ***df* = 3** |
|---|---|---|---|---|---|
| **5 µM** | **0.4** | **1.6** | *20 %* | *3.6 %* | *0.016 %* |
| **10 µM** | **0.8** | **2.2** | *20 %* | *0.7 %* | *0.04 %* |

Tableau III.C. Quantité relative de multimères en fonction de la morphologie de ceux-ci.

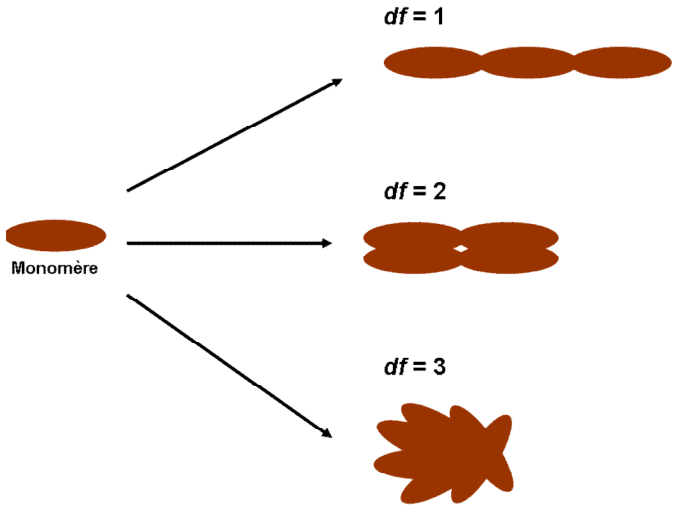



Fig III.A.19. Associations possibles des monomères d'ezrine afin de former des oligomères. *df* est la dimension fractale de l'oligomère.

Les expériences de Western Blot permettent d'avoir un rapport massique. En effet le monomère d'ezrine apparaît à une hauteur correspondante à un poids de 81 kDa et les

oligomères apparaissent à un poids de 120 kDa et 200 kDa. Il est possible d'avoir une évaluation du rapport *a*. Le tableau III.D montre la comparaison entre les rapports massiques déduits de la diffusion statique de la lumière et les rapports massiques déduits des Western Blot.

| **Diffusion** $\omega = 0.8$ | | **Western Blot** $\omega = 10$ |
|---|---|---|
| $df = 1$ | $a = 2.7$ | $a = 1.4$ |
| $df = 2$ | $a = 7.2$ | |
| $df = 3$ | $a = 20$ | $a = 2.4$ |

Tableau III.D. Comparaison des rapports massiques calculés en diffusion et en western Blot.

En se basant sur les expériences de Western Blot et de diffusion, le rapport massique est de l'ordre de 1.4 à 7.2. La dimension fractale de l'oligomère compatible avec les deux expériences précédentes (Diffusion et Wester Blot) serait située entre 1 et 2. En effet avec un assemblage compacte ($df = 3$), les quantités d'oligomères sont négligeables et le rapport massique est de l'ordre de 20, ce qui n'est manifestement pas le cas à la vue des expériences de diffusion. La seule solution pour que les expériences de Western Blot soient compatibles avec les expériences de diffusion de lumière est de supposer que la dimension fractale de l'agrégat soit de l'ordre de 1. Si la dimension fractale de l'oligomère est de 1, alors la diffusion statique de lumière permet de dire que le rapport *y* est de l'ordre d'une vingtaine de pourcent au moins.

La quantité d'oligomères présents est corroboré par une étude de Gautreau et collaborateurs (**Gautreau et al. 2000**) qui a montré par gel filtration que dans des cellules épithéliales LLC-PK1 (cytosol et membrane), 14.6 % de l'ezrine existe sous forme oligomèrique.

**Les monomères d'ezrine s'associent entre eux d'une manière non compacte. Il existe une quantité non négligeable d'oligomères que l'on estime à environ 20 %.**

**iv)** Il n'y a, à l'heure actuelle, aucun modèle défini pour expliquer l'oligomérisation dépendante du PIP2. Lorsque nous utilisons de l'ezrine 6N (mutée sur le domaine FERM), nous constatons que nous n'avons pas de formation de multimères en présence de PIP2. L'absence de multimères avec l'ezrine 6N confirme que cette ezrine mutée n'interagit pas de la même manière que la WT. Donc le domaine FERM et la liaison au PIP2 sont importants pour l'oligomérisation. Les modèles d'interaction qui pourraient rendre compte de l'oligomérisation sont des modèles faisant intervenir le domaine FERM, soit (*III.B.20*) :

- Modèle A : des oligomères d'ezrine formés par des interactions intermoléculaires entre C-terminal et FERM
- Modèle B : des oligomères d'ezrine formés par des interactions entre domaines FERM de plusieurs ezrine.

Les inconvénients et les avantages de chaque modèle vont être présentés.

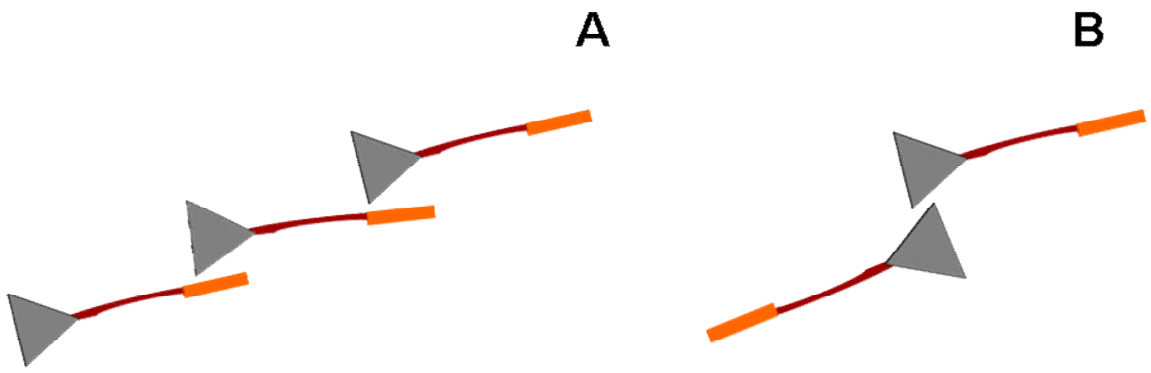



Fig III.B.20. les différents modèles d'oligomérisation qui sont envisagés. (A) Oligomérisation par les interactions C-terminal / FERM et (B) oligomérisation par des interactions FERM / FERM.

**Le modèle A**

Dans le cas d'une oligomérisation dépendante du PIP2, le modèle ne semble pas adapté car nous avons montré que le PIP2 « fragilise » les interactions intramoléculaires entre le domaine FERM et le domaine C-terminal et induit un changement conformationnel. Alors, il parait peu probable que les interactions intramoléculaires soient conservées. Néanmoins, si le PIP2 n'induit pas un dépliement complet de la molécule et qu'il existe toujours des interactions entre domaine FERM et C-terminal, le PIP2 pourrait favoriser les interactions intermoléculaires (oligomérisation) au détriment des interactions intramoléculaires (ouverture partielle). De plus ce mode d'association forme des agrégats non compacts et plutôt linéaire et cela serait en accord avec la diffusion de lumière. Aussi, il existe dans ce modèle, des possibilités de former des oligomères d'ordre supérieur à l'ordre deux, ce qui est en accord avec les expériences de Western Blot qui nous montrent au moins des dimères et des trimères.

**Le modèle B**

La deuxième voie d'oligomérisation possible est une oligomérisation *via* une interaction entre domaine FERM. Les expériences de fluorescence du tryptophane et de Western Blot montrent que les chaines d'acide gras peuvent être importantes (présence de la poche hydrophobe dans le domaine FERM). A partir de cette constatation il est possible de penser qu'il existe

plusieurs sites d'interaction dans le domaine FERM pour le PIP2. La conséquence de la présence de plusieurs sites d'interactions pourrait être d'induire une interaction FERM / FERM via le PIP2 (interaction de la tête sur une ezrine, et des queues hydrophobes sur un autre site par exemple). Une association FERM / FERM ne fait pas appelle au domaine C-Terminal, cela est compatible avec un changement conformationnel de l'ezrine. Néanmoins, une telle association donne naissance à des agrégats plutôt compacts, ce qui n'est pas en accord avec les expériences de diffusion de lumière. Aussi, une association *via* les domaines FERM donnerai des oligomères difficilement plus gros que la taille de deux ezrines, de plus, il est peu probable de former des oligomères plus gros que des dimères. Or en diffusion de lumière, des oligomères plus grand que des dimères sont observés, il en est de même en Western Blot où nous observons des trimères au moins.

Le tableau III.E synthétise les avantages et les inconvénients de chaque modèle.

| **Interaction C-terminal / FERM** | **Interaction FERM / FERM** |
|---|---|
| **Avantages :**<br>- Association non compacte.<br>- Possibilité de former plus que des dimères (espèces plus lourdes et plus grande que les dimères)<br><br>**Inconvénient :**<br>- La liaison au PIP2 fragilise les interactions entre C-Terminal et FERM | **Avantage :**<br>- Ne fait pas intervenir le domaine C-Terminal<br><br>**Inconvénients :**<br>- Comment former des espèces plus lourdes que des dimères ?<br>- Association plutôt compacte<br>- Taille équivalente à dimères même pour des oligomères d'ordre supérieur |

Tableau III.E. Présentation des avantages et inconvénients de chaque modèle.

Une étude de Zhu et collaborateurs (**Zhu et al. 2005**) a montré, par des mesures de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) sur des cellules pariétales gastriques, que les interactions entre domaine C-terminal et domaine FERM sont les précurseurs de l'oligomérisation de l'ezrine. Dans leur étude, les oligomères sont montrés comme des formes inactives liées à la membrane plasmique. En effet lorsqu'ils stimulent les cellules, ils observent la diminution de la quantité d'oligomères au profit d'une augmentation de la quantité de monomères.

Une étude un peu plus ancienne de Berryman et collaborateurs (**Berryman et al. 1995**), montre également la présence de d'oligomères d'ezrine dans des extrait de placenta, mais contrairement à Zhu et collaborateurs, les auteurs pensent que la forme active de l'ezrine est

sous forme d'oligomères, et que ces oligomères font toujours appel à des interactions entre C-terminal et FERM. Même si les différentes ne sont pas d'accord sur la forme active ou inactive des oligomères d'ezrine, elles s'accordent toutes sur le fait que ces oligomères existent et que ce sont des interactions entre le domaine FERM et le domaine C-terminal qui est importante.

Nos expériences ne permettent pas de trancher clairement entre les deux modèles proposés. Il n'y a pas de modèle clair pour expliquer la formation de ces oligomères dans la littérature, néanmoins ce sont les interactions entre le domaine FERM et le domaine C-terminal qui sont avancées. De plus l'activité et le rôle de ces oligomères n'ont pas encore été élucidés : sont-ils actifs ou inactif ? Est-ce que cela peut dépendre du type cellulaire ? Quel est leur rôle ?
Pour réussir à trouver un modèle consistant avec les données de la littérature et les résultats que nous avons obtenus avec le PIP2, l'étape suivante serait de faire une cartographie du domaine FERM à l'aide de mutagenèse dirigée afin d'identifier les possibles sites d'interactions entre ezrine et PIP2 ainsi qu'entre ezrine et ezrine.

### III.A.3 – Bilan

Le PIP2 induit un changement conformationnel de l'ezrine et permet la multimérisation de celle-ci. Un mécanisme d'interaction qui ferait intervenir la poche hydrophobe du domaine FERM et l'une des chaines carbonées du PIP2. L'existence de la poche hydrophobe au sein du domaine FERM peut jouer un rôle en interagissant avec une des chaines hydrophobes du PIP2 lorsque c'est possible. L'interaction semble forte et résiste au gel SDS-Page, ce qui n'est pas le cas lorsque l'ezrine interagit avec du PIP2 dans une membrane de LUV.
Le mécanisme d'oligomérisation n'est pas connu et nul doute que d'autres expériences seront nécessaires pour étudier le rôle exact du domaine FERM et du PIP2, dans les associations ezrine / ezrine.

Les investigations sur la liaison de l'ezrine au PIP2 montrent que les mécanismes et les comportements de l'ezrine en présence de PIP2 sont complexes. Toutefois une interaction à été mise en évidence entre l'ezrine et le PIP2 *in vitro*. Le but étant de reconstruire un système biomimétique, la prochaine étape consiste à reconstruire des vésicules géantes contenant du PIP2 et à étudier le comportement de la protéine sur la membrane de la vésicule : l'ezrine interagit-elle avec le PIP2 dans la membrane de la vésicule ? Quelles sont les conséquences de la liaison de l'ezrine en termes de répartition de lipides et de protéines ? Le chapitre suivant montrera comment il est possible de construire des vésicules contenant du PIP2 et montrera que l'ezrine est capable d'interagir avec celles-ci.

# III.B – Vésicules géantes incorporant du PIP2 : caractérisation et interaction avec l'ezrine

Les vésicules géantes unilamellaires (GUV) sont préparées par électroformation (voir chapitre II). Les GUV sont constituées de DOPC avec des quantités croissantes de PIP2 sans ajout de cholestérol ou bien en présence de 15% en masse de cholestérol. Dans cette partie nous allons quantifier l'incorporation du PIP2 dans les vésicules géantes et établir la composition lipidique utilisée par la suite. Aussi, la stabilité des vésicules dans différentes solutions tampon sera également étudiée, et enfin l'interaction entre les vésicules et l'ezrine sera visualisée.

## III.B.1 – Caractérisation de l'insertion du PIP2 dans la membrane des GUV

Le premier pas dans la construction d'une vésicule lipidique contenant du PIP2 est de vérifier et de quantifier l'incorporation effective du lipide au sein de la membrane. En effet, il est connu que l'électroformation de vésicules géantes est plus difficile en présence de lipides chargés (**Rodriguez et al. 2005**). De plus, le PIP2 est un lipide qui préfère former des micelles en solution (**Moens et al. 2007; Sugiura 1981**), aussi son incorporation au sein d'une membrane localement plane, comme celle d'une GUV n'est pas a priori favorisée par sa géométrie. Il apparaît donc nécessaire de caractériser l'incorporation effective du PIP2 dans la membrane des GUV fabriquées par électroformation.
Deux techniques ont été utilisées : une technique de visualisation directe utilisant du PIP2 fluorescent et une technique de visualisation indirecte utilisant des anticorps couplés à un fluorophore.

### *III.B.1.a – Visualisation en immunofluorescence*

Le marquage des GUV en immunofluorescence consiste à mettre en contact les vésicules d'abord avec un anticorps primaire anti-PIP2, puis avec un anticorps secondaire fluorescent. L'anticorps primaire va se fixer sur la tête polaire du PIP2 (la tête est l'épitope),

et l'anticorps secondaire fluorescent vient se fixer sur l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire révèle la localisation du PIP2 s'il est présent (*fig III.B.1*).

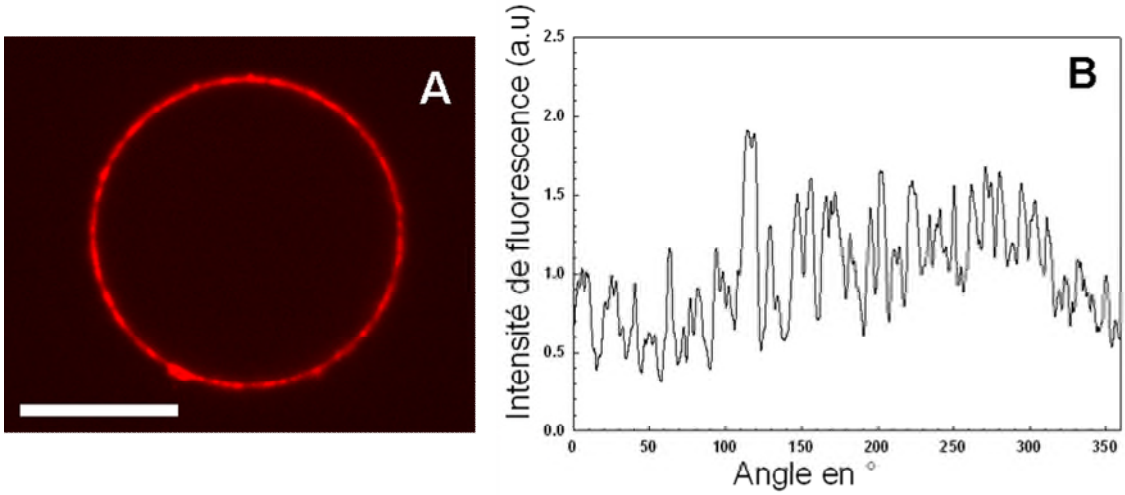



Fig III.B.1. (A) GUV contenant 5% PIP2 et marquée par un anticorps secondaire fluorescent et (B) profil d'intensité correspondant à son contour. La barre d'échelle représente 10 µm.

L'échafaudage immunologique peut être agrandi d'un étage : des anticorps primaires anti-PIP2, puis des anticorps secondaires non fluorescents sont ajoutés aux GUV et enfin des anticorps tertiaires fluorescents. L'anticorps tertiaire fluorescent vient interagir avec l'anticorps secondaire, qui est lui-même lié à l'anticorps primaire anti-PIP2 (*fig III.B.2*).

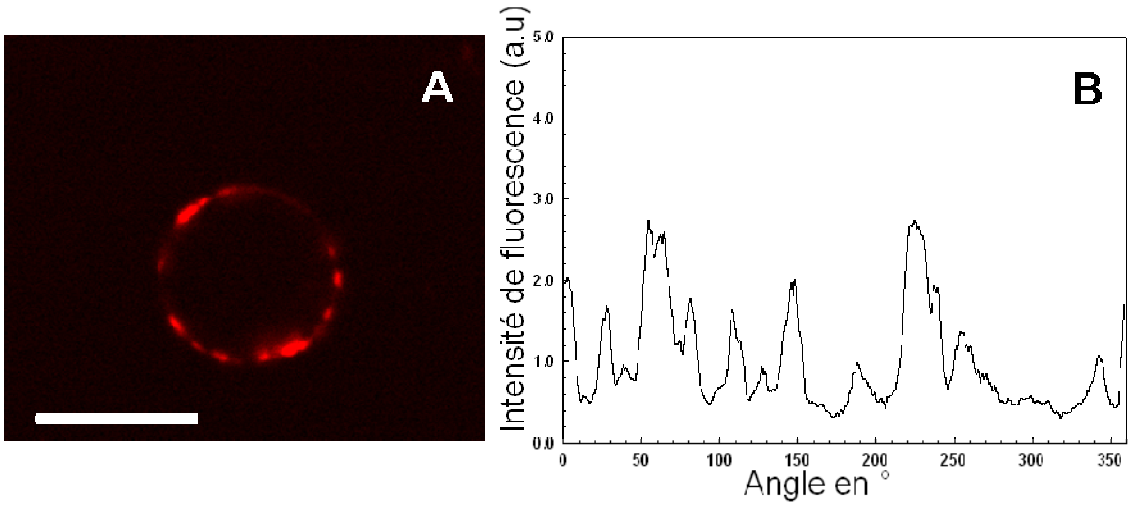



Fig III.B.2. (A) GUV contenant 5% PIP2 et visualisée par un anticorps tertiaire fluorescent et (B) profil d'intensité correspondant à son contour. La barre d'échelle représente 10µm.

Dans nos expériences, toutes les vésicules géantes sont marquées par les anticorps fluorescents lorsque le mélange de lipide initial contient du PIP2 (1%, 2% ou 5% en masse de

PIP2), ce qui dénote la présence de PIP2 dans la membrane des GUV. En revanche, les vésicules dont les mélanges de lipides initiaux ne contiennent pas de PIP2 ne sont pas visibles en fluorescence.

Un calcul simple permet d'estimer la quantité d'anticorps qui interagissent avec les vésicules. En effet, lors de l'électroformation, la quantité de lipides en solution peut être estimée à 50 µg/mL. Pour des GUV contenant 5 % en PIP2, 100 µL de solution contiennent au maximum $1.25.10^{-10}$ moles de PIP2. Nous avons ajouté 1 µL d'anticorps à une concentration de 10 µg/mL, soit 0.01 µg, ce qui représente environ $5.10^{-11}$ moles. L'anticorps primaire interagit avec deux PIP2. Dans le cas idéal, nous ne pouvons donc lier que $1.10^{-10}$ moles de PIP2, ce qui représente 80 % du PIP2 présent sur les GUV. Dans la réalité, il faut prendre en compte que tous les anticorps ne vont pas interagir avec les GUV, notamment en raison de pertes dues à l'absorption non spécifique des anticorps sur le tube par exemple. Ainsi, seule une fraction du PIP2 est marquée. Donc un marquage à l'aide d'anticorps ne peut pas donner d'informations sur la quantité de PIP2 inséré dans la membrane.

***III.B.1.b –Visualisation en fluorescence***

Le marquage à l'aide d'anticorps est une méthode de détection indirecte. Pour vérifier l'incorporation du PIP2, des analogues fluorescents du PIP2 sont utilisés en tant que traceurs et mélangés initialement avec les lipides non fluorescents. Ils sont intégrés en faible quantité (0.1% en masse) dans le mélange de lipides initial. En effet, lorsque le PIP2 fluorescent est inséré à plus de 0.8 % il ne fluorescence pas plus (une extinction de fluorescence ou phénomène de « quenching »).

Notre critère pour affirmer que l'incorporation d'analogues fluorescents du PIP2 est satisfaisante est l'uniformité du marquage fluorescent au sein d'une population de GUV. Lorsque toutes les vésicules ne sont pas marquées en fluorescence ou lorsqu'il existe de grandes disparités dans les intensités de fluorescence, nous estimons que l'incorporation du PIP2 fluorescent n'est pas satisfaisante.

L'incorporation des différents PIP2 fluorescents a été testée avec différentes compositions de GUV et en variant la température d'électroformation. L'ensemble des conditions expérimentales testées sont résumées dans le tableau III.F.

Les PIP2 fluorescents à courtes chaines (C6) ne s'insèrent pas dans la membrane par électroformation quelle que soit la composition du mélange de lipide initial et quelle que soit la température d'électroformation.

Les PIP2 fluorescents à longues chaines (C16) s'insèrent dans les membranes. Le FL-PIP2 ne s'incorpore pas bien dans la membrane des GUV lorsque l'électroformation est faite à température ambiante (25°C). En effet, toutes les vésicules ne sont pas marquées en fluorescence : le marquage de la population des GUV est non uniforme. Lorsque l'électroformation est faite à 37°C, toutes les vésicules sont marquées par le FL-PIP2 avec des intensités de fluorescence égales. Le TMR-PIP2 a le même comportement que le FL-PIP2 en ce qui concerne l'incorporation lors de l'électroformation.

L'incorporation des FL-PIP2 (C16) et TMR-PIP2 (C16), est visualisée en microscopie confocale sur la figure III.B.3.

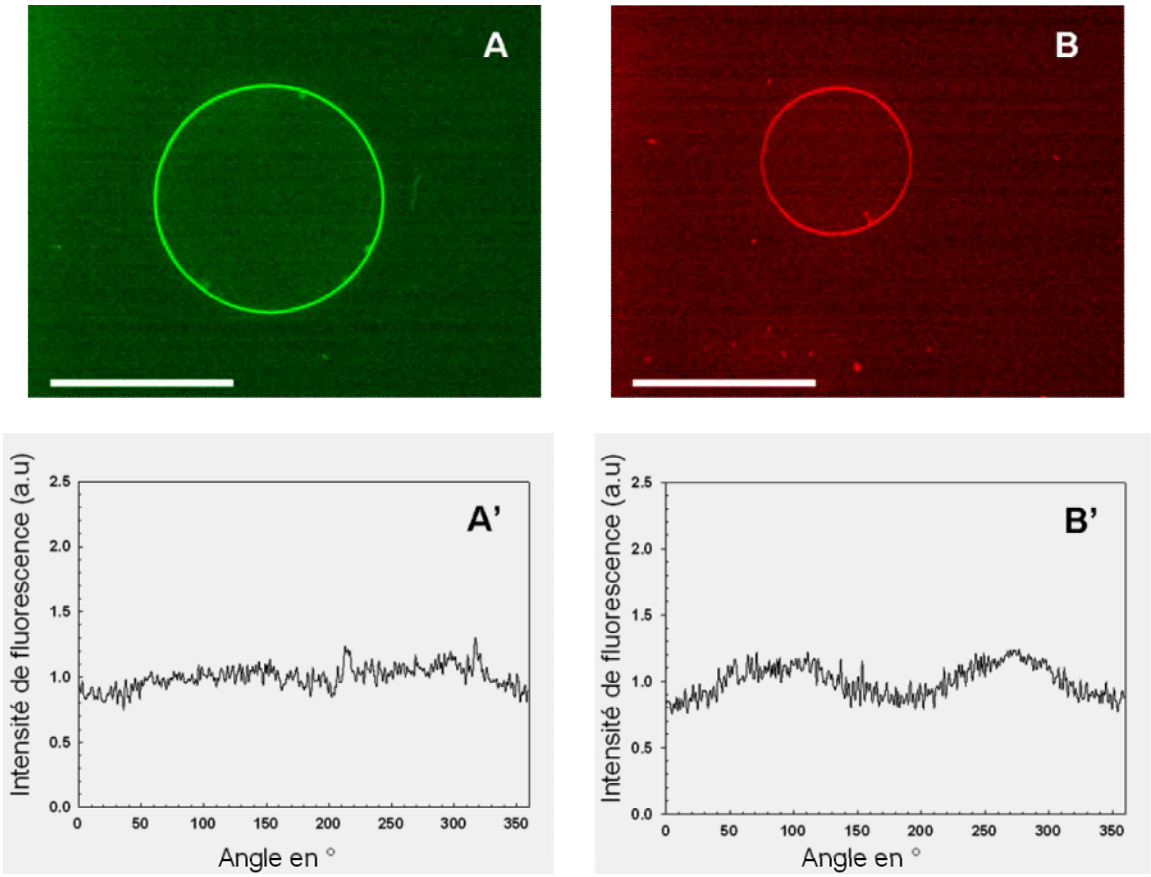



Fig III.B.3. (A et A') Observation d'une GUV contenant du FL-PIP2 (C16) et profil d'intensité correspondant à son contour, (B et B') Observation d'une GUV contenant du TMR-PIP2 (C16) et profil d'intensité correspondant à son contour. La barre représente 50µm.

Néanmoins nous avons remarqué une différence de comportement importante entre le FL-PIP2 et le TMR-PIP2 : lorsque des GUV non marquées sont mises en contact avec la solution de gonflement dans laquelle du TMR-PIP2 est présent, les GUV se marquent en fluorescence. Ce phénomène d'insertion spontanée du PIP2 fluorescent n'est pas observé lorsque des GUV sont mises en contact avec du FL-PIP2.

Par ailleurs, nous avons aussi noté que le PIP2 natif ne s'insère pas spontanément dans la membrane des GUV lorsqu'il est mis en contact avec celle-ci. Cette absence d'insertion spontanée du PIP2 a été mise en évidence par un marquage anticorps qui s'est révélé négatif. Ces observations sont aussi reportées dans le tableau III.F.

| **Phosphoinositides** | **Température électroformation** | **Marquage anticorps** | **Marquage PIP2 fluorescent** | **Insertion spontanée du PIP2 dans GUV** |
|---|---|---|---|---|
| PIP2 | 25°C | Oui | Non pertinent | NON |
| PIP2 | 37°C | Oui | Non pertinent | NON |
| FL-PIP2 (C16) | 25°C | Oui | Non uniforme | NON |
| FL-PIP2 (C16) | 37°C | Oui | Uniforme | NON |
| FL-PIP2 (C6) | 25°C | Pas de marquage | Pas de marquage | NON |
| FL-PIP2 (C6) | 37°C | Pas de marquage | Pas de marquage | NON |
| TRM-PIP2 (C16) | 25°C | Oui | Non uniforme | OUI |
| TRM-PIP2 (C16) | 37°C | Oui | Uniforme | OUI |

Tableau III.F. Résumé des conditions expérimentales utilisées lors de l'électroformation.

Il semble en outre que la température soit un paramètre très important pour l'incorporation effective du PIP2 dans la membrane. En revanche, la présence de cholestérol dans le mélange de lipides initial ne semble pas influencer l'incorporation des analogues fluorescents du PIP2 (données non présentées).

### ***III.B.1.c – Comparaison des deux méthodes de visualisation du PIP2***

Le marquage à l'aide de PIP2 fluorescents donne des informations sur la répartition spatiale du lipide mais il ne peut donner d'information sur la quantité de PIP2 incorporée dans la membrane car il est inséré en très petite quantité (0.1% en masse) et l'inséré en plus grande quantité ne donne aucunes informations de quantité à cause de phénomène d'extinction de

fluorescence (« quenching »). De la même manière, le marquage en immunofluorescence ne peut pas donner d'informations quantitatives sur l'incorporation du PIP2.

Afin de quantifier et comparer les différents marquages, une analyse de déviation standard a été réalisée. L'intensité moyenne du profil *IMean* est mesurée. La déviation standard $\sigma$ du profil d'intensité le long de la membrane représente l'hétérogénéité de la membrane. Nous estimons qu'une vésicule est marquée d'une façon homogène lorsque le rapport $\sigma/IMean$ est inférieur à 15%. (voir chapitre II). Des exemples de profils sont donnés sur les figures III.B.1(B) et III.B.2(B). La figure III.B.4 représente les rapports $\sigma/IMean$ de vésicules marquées par des anticorps et par un analogue fluorescent du PIP2.
Pour les GUV visualisées par insertion directe d'un analogue fluorescent $\sigma/IMean = (10 \pm 2)\%$ . Pour les GUV marquées avec des anticorps secondaires, on mesure $\sigma/IMean = (24.7 \pm 6.5)\%$ (analyse faite sur une quinzaine de GUV), ce qui montre un marquage hétérogène de la membrane. Enfin, les GUV marquées par l'anticorps tertiaire sont caractérisées par $\sigma/IMean = (44.9 \pm 14.9)\%$ (analyse faite sur une quinzaine de GUV).

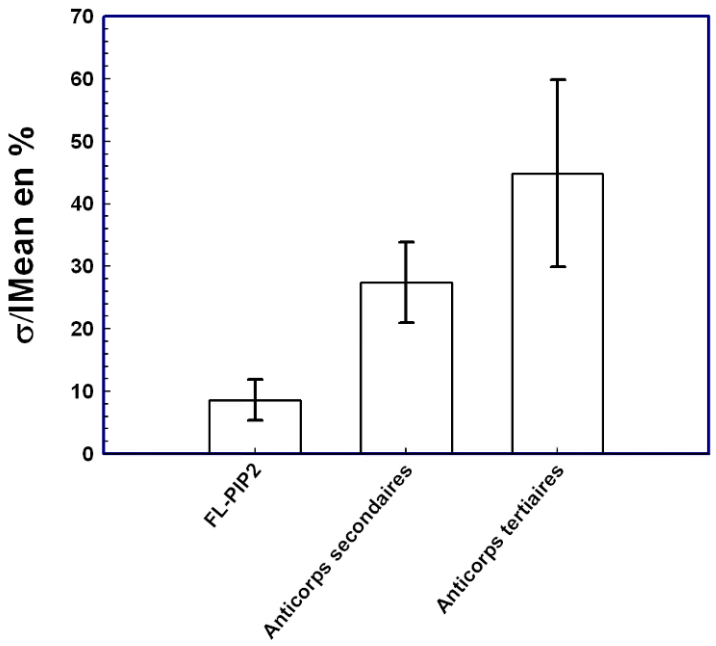



Fig III.B.4. Rapports $\sigma/IMean$ calculés pour différents types de marquages : à l'aide d'un analogue fluorescent, avec des anticorps secondaires et tertiaires. La barre d'erreur représente la déviation standard.

Une corrélation entre la taille du complexe de détection et le rapport $\sigma/IMean$ apparaît : plus les complexes de détections sont lourds et plus le marquage est hétérogène. Les anticorps (primaires, secondaires et tertiaires) forment des complexes qui viennent interagir avec la membrane. La liaison de ces complexes d'immunoglobulines à plusieurs PIP2 de la membrane peut induire une répartition non homogène de la fluorescence.

L'anticorps primaire interagit avec deux molécules de PIP2, puis plusieurs anticorps secondaires se fixent sur l'anticorps primaire. Lorsque des anticorps tertiaires sont présents, ils viennent interagir avec l'anticorps secondaire. Nous montrons sur la figure III.B.5 une vision schématique de l'échafaudage de détection.

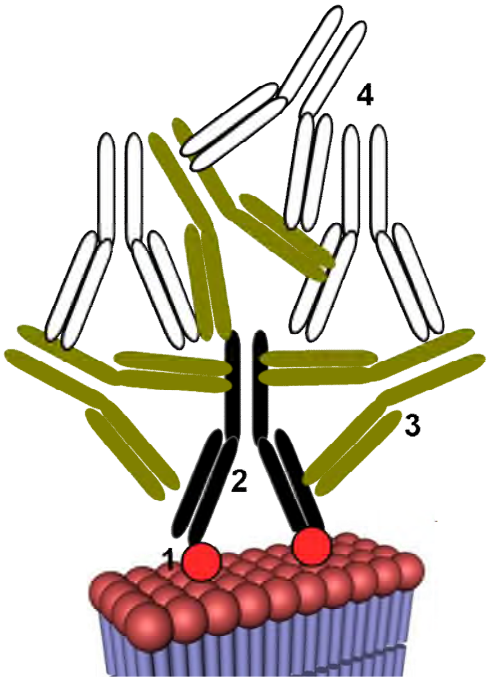



Fig III.B.5. Schéma du complexe de détection sur la membrane. (1) Le PIP2 dans la membrane, (2) l'anticorps primaire, (3) les anticorps secondaires et (4) les anticorps tertiaires.

La répartition de fluorescence observée en présence des anticorps est attribuée à un artefact dû à la technique de détection. En effet, l'agrégation des anticorps ainsi que la divalence des anticorps primaires peut conduire à la présence d'agrégats d'anticorps pouvant influer sur la perception que nous avons de la répartition du PIP2 au sein de la membrane.

**Le marquage des GUV par les anticorps n'est pas quantitatif et ne peut refléter ni la répartition du PIP2 dans la membrane, ni la quantité de PIP2 incorporé. Le marquage à l'aide d'analogues fluorescents du PIP2 donne des informations sur la répartition du**

**lipide dans la membrane mais il ne peut pas donner d'information sur la quantité de lipide dans celle-ci.**

### ***III.B.1.d – Influence de la longueur de chaîne des analogues et du type de fluorophore***

Les analogues fluorescents du PIP2 présentent des comportements différents du PIP2. Les PIP2 à courtes chaines (6 carbones) ne s'insèrent pas avec le protocole d'électroformation utilisé. Nous pensons que ceux-ci ne sont pas assez hydrophobes pour s'insérer spontanément dans la membrane des vésicules lors du gonflement sous champ électrique.

Les analogues à longues chaines (16 carbones) s'insèrent bien dans les vésicules quand l'électroformation est réalisée à 37°C mais pas à 25°C. Dans ce dernier cas, certaines GUV ne sont pas marquées et d'autres présentent des intensités de fluorescence de leur membrane très variables.

De façon surprenante, lorsque nous effectuons un profil le long de la membrane de GUV qui contiennent du PIP2 fluorescent, nous observons une modulation du signal d'intensité avec le TMR-PIP2 et pas avec le FL-PIP2. Une courbe de type $\sin(\theta)^2$ peut être ajustée sur le profil d'intensité du TMR-PIP2. Sur la figure III.B.6 (A) est représenté le profil du contour d'une GUV contenant du TMR-PIP2 et son ajustement par une fonction en $\sin^2(\theta)$ :

$$I = A + B \times \sin(\theta)^2 \quad (30)$$

Où $I$ est l'intensité mesurée, $\theta$ est l'angle azimutal le long du contour de la GUV, $A$ est la ligne de base et $B$ est l'amplitude de modulation.

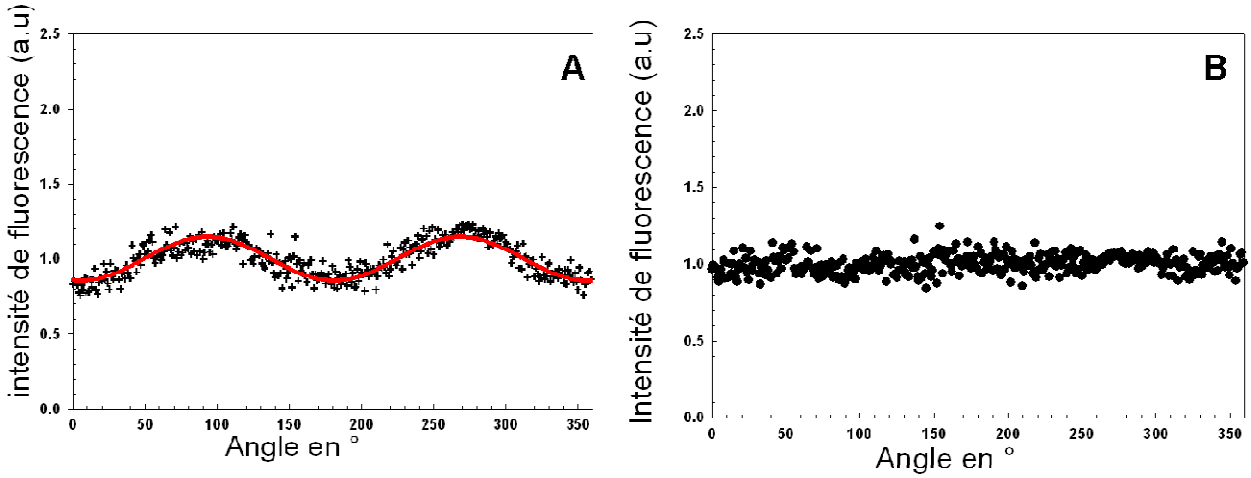



Fig III.B.6. (A) Profil d'intensité du contour d'une GUV contenant du TMR-PIP2 : le signal d'intensité est modulé par une fonction en $\sin(\theta)^2$. La ligne en trait plein représente la fonction d'ajustement (équation 30) (B) Même profil d'intensité normalisé par les valeurs issues de l'ajustement avec la fonction $\sin(\theta)^2$.

Sur la figure III.B.6 (B) le signal d'intensité a été divisé par la fonction d'ajustement en sin². Nous retrouvons un profil d'intensité comparable à celui du FL-PIP2, c'est à dire avec des rapports $\sigma/IMean$ de 10%.

Pour essayer de comprendre la différence de comportement entre les deux analogues fluorescents du PIP2 nous montrons en figure III.B.7 (A) et (B) les structures chimiques des deux fluorophores utilisés.

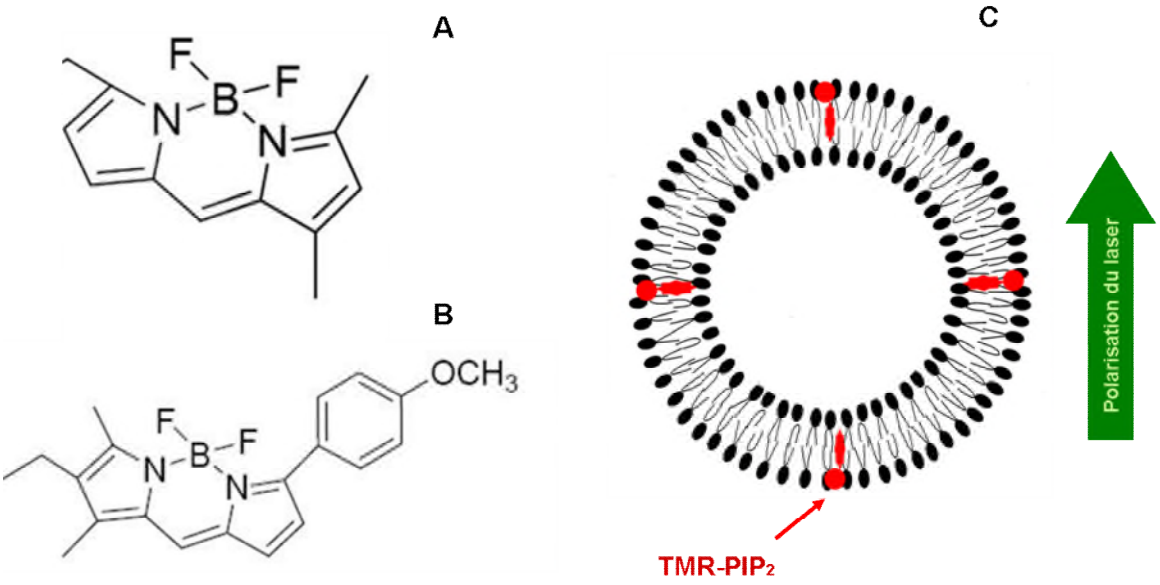



Fig III.B.7. (A) Fluorophore présent dans le FL-PIP2. (B) Fluorophore présent dans le TMR-PIP2. (C) Schéma représentant la lumière polarisée du laser du microscope confocal qui éclaire une GUV. Nous voyons que dans la GUV le fluorophore n'est pas orienté de la même façon par rapport à la polarisation du laser suivant sa position dans la membrane.

Le fluorophore du TMR-PIP2 en (B) possède un cycle aromatique de plus que le fluorophore du FL-PIP2 en (A), ce qui le rend plus hydrophobe. Nous supposons que le TMR-PIP2 s'insère mieux dans la membrane et que, par sa structure hydrophobe, il est plus rigide et mieux organisé au sein de celle-ci (*fig III.B.7(C)*). Un tel effet de modulation de l'intensité lumineuse en fonction de l'angle a déjà été reporté dans la littérature par O. Sandre (**Sandre 2000**) sur les GUV mais avec un autre type de fluorophore.

Le fait que le TMR-PIP2 rentre spontanément au contact des GUV, là où les autres PIP2 ne s'insèrent pas (FL-PIP2 et PIP2 natif), confirme qu'il est plus hydrophobe mais confirme également qu'il n'a pas le même comportement que le PIP2 natif.

**L'analogue fluorescent du PIP2 qui a le comportement le plus proche du PIP2 est le FL-PIP2 à longues chaines (16 carbones). Dans la suite, nous choisissons le FL-PIP2 comme traceur fluorescent dans les GUV et comme témoin de la répartition du PIP2 au sein de la membrane.**

### ***III.B.1.e – Potentiel zêta sur les GUV : validité de la technique***

Etant donné que le marquage à l'aide d'analogues fluorescents ne donne pas d'informations quantitatives sur l'insertion du lipide sans fluorophore, des mesures complémentaires du potentiel zêta, $\xi$, des vésicules ont été réalisées. Il est à noter que l'incorporation quantitative du PIP2 par mesure de potentiel zêta a déjà été utilisée sur des MLV et sur des LUV (**Toner et al. 1988; Blin et al. 2008**), mais jamais sur des vésicules géantes jusqu'à présent. La mesure sur des GUV était a priori délicate à cause de la taille et de la fragilité des vésicules. Les GUV sont soumises à un champ électrique lors de la mesure, et, sur les appareils de précédente génération, les champs électriques appliqués étaient trop élevés, de l'ordre de quelques kilovolts par centimètre. Désormais la mesure est effectuée avec un champ électrique dont la valeur est comprise entre 50 $V.cm^{-1}$ et 350$V.cm^{-1}$. Certaines études ont en effet déjà montré qu'il est possible de déformer voire détruire les vésicules sous champ électrique avec des valeurs de champs électriques allant de quelques centaine de volt par centimètre à quelques kilovolts par centimètre (**Dimova et al. 2007; Riske et al. 2005**).

Nous formons des GUV dans lesquelles la quantité de PIP2 ajouté dans le mélange de lipides initial a été variée. Nous avons également étudié l'effet de la présence de cholestérol (15% en masse) dans les GUV. Les vésicules sont conservées dans leur solution de gonflement et les mesures du potentiel également effectuées dans celle-ci afin d'éviter que les GUV ne sédimentent.

Dans ce type de mesures, les GUV sont considérées comme des colloïdes chargés en solution. La taille des GUV est bien supérieure à la longueur de Debye : la GUV possède un diamètre de l'ordre de la dizaine de micromètres et la longueur de Debye dans la solution de gonflement est d'une dizaine de nanomètres (**Israelachvili 1991**). Nous nous plaçons dans le cas de la relation de Henry avec $\kappa^{-1}$ négligeable devant le rayon de la particule (voir chapitre II).

Les GUV sont composées de DOPC (avec ou sans cholestérol) avec des quantités variables de PIP2. Le potentiel zêta obtenu avec les GUV sera comparé au potentiel zêta de LUV. Les LUV sont composées de POPC avec des quantités variables de PIP2. Pour faire la mesure, les

GUV ne doivent pas sédimenter pas dans la cellule de mesure et la solution de GUV ne doit pas contenir d'agrégats de lipides (voir le chapitre II).

Lorsque la préparation de GUV vérifie les critères précédents, nous pouvons effectuer la mesure. La figure III.B.8 montre les distributions de potentiel zêta mesuré par le Malvern Nano ZS, pour des compositions croissantes de PIP2 dans les GUV. Dans tous les cas, un seul pic de potentiel est observé, ce pic de potentiel devient plus négatif lorsqu'il est inséré plus de PIP2 dans le mélange de lipides qui sert à faire croître les GUV. La largeur à mi-hauteur des pics est de l'ordre de 10 mV. Nous pensons que cette dispersion est raisonnable et qu'elle indique une homogénéité de composition en PIP2 de la population de GUV.

Dans tous les cas, la distribution du potentiel indique que la répartition du PIP2 est homogène entre les GUV d'une même population. Si tel n'était pas le cas, nous observerions plusieurs pics ou une distribution très large de potentiels.

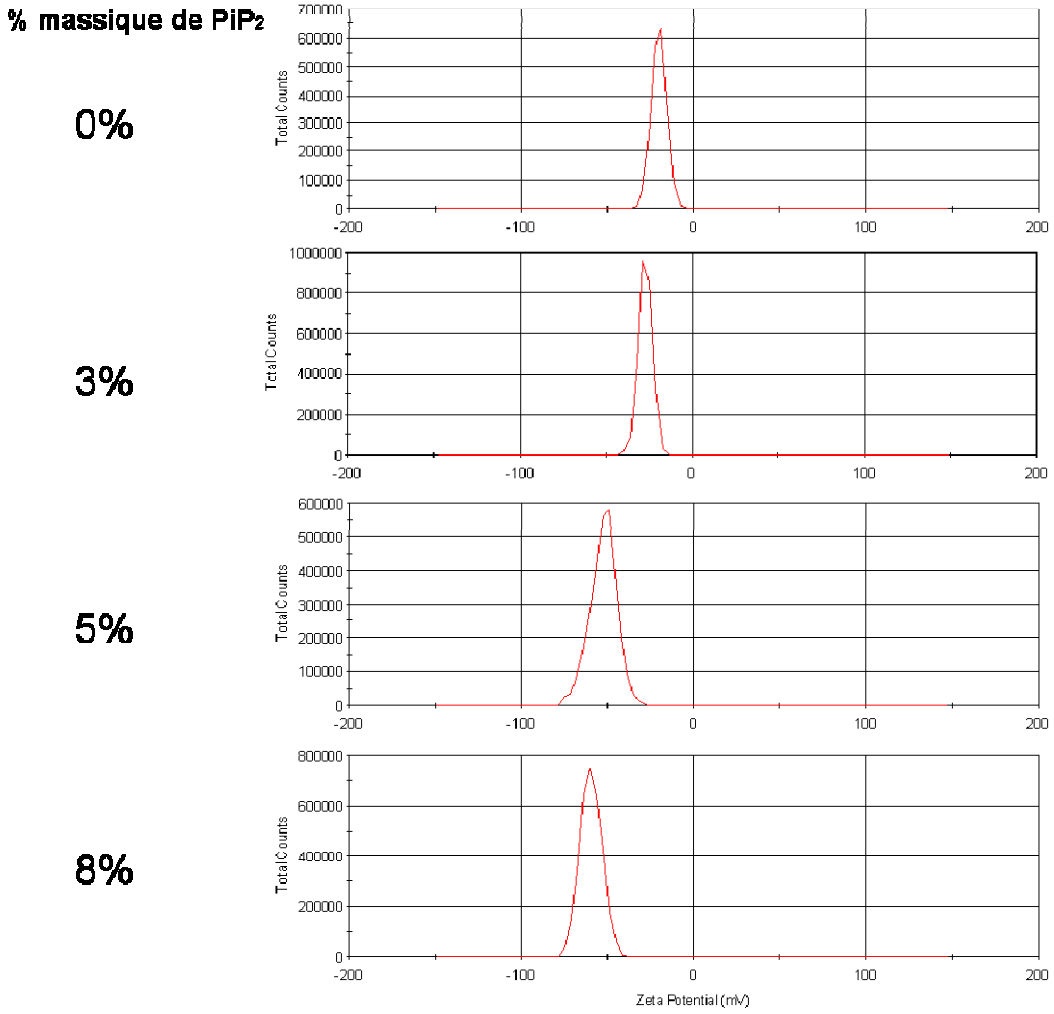



Fig III.B.8. Mesures du potentiel zêta sur des GUV de différentes compositions en PIP2. Plus la concentration en PIP2 est élevée, plus le potentiel se décale vers des valeurs négatives.

Sur la figure III.B.9(A), nous représentons les données correspondant à un mélange de solutions de GUV préparer avec 5 % de PIP2 8 % de PIP2 dans le mélange de lipides initial. Avec le mélange de GUV de compositions différentes en PIP2, il apparaît deux pics de potentiel bien distincts correspondants aux valeurs des potentiels de GUV 5% PIP2 et de GUV 8% PIP2. Afin de vérifier que le mélange de deux populations vésicules de tailles différentes donne également une distribution bimodale du potentiel zêta, nous réalisons des mélanges LUV / GUV contenant 0 ou 1 % de PIP2. Dans ce cas la figure III.B.9(B) montre que le potentiel $\xi$ a une distribution bimodale.

Donc la méthode est assez sensible pour discriminer des mélanges de vésicules de différents pourcentages de PIP2 et donc pour mesurer l'homogénéité de l'incorporation du PIP2.

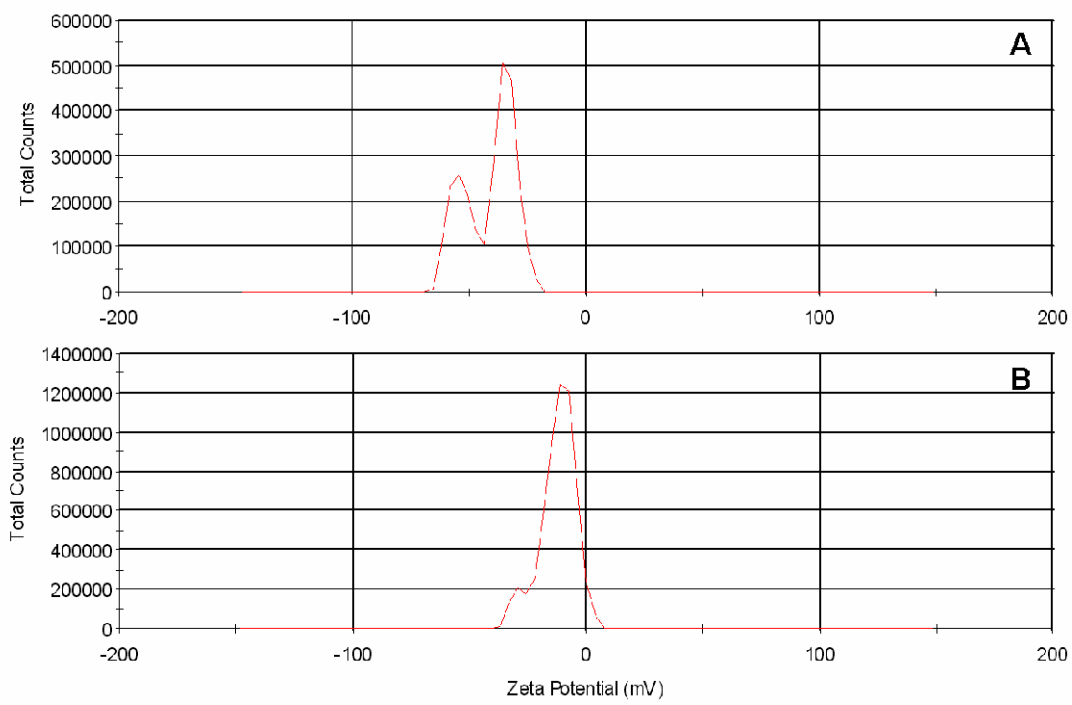



Fig III.B.9. (A) Distribution du potentiel zêta pour un mélange de GUV 5% PIP2 et de GUV 8% PIP2. (B) Un mélange de GUV 1% PIP2 et de LUV 0% PIP2.

Nous avons également cherché à comparer les GUV et les LUV, pour lesquelles ce type de mesure est déjà bien établi. Le potentiel zêta de GUV contenant 15% de cholestérol et le potentiel zêta de LUV, fabriquées à partir de lipides incorporant des quantités variables de PIP2 sont représentés sur la figure III.B.10.

Dans les deux cas, le potentiel décroît lorsque le pourcentage de PIP2 augmente. Néanmoins, lorsque nous comparons les potentiels zêta de LUV et de GUV, nous nous apercevons que le potentiel des GUV est toujours plus bas que celui des LUV (*fig III.B.10(A)*).

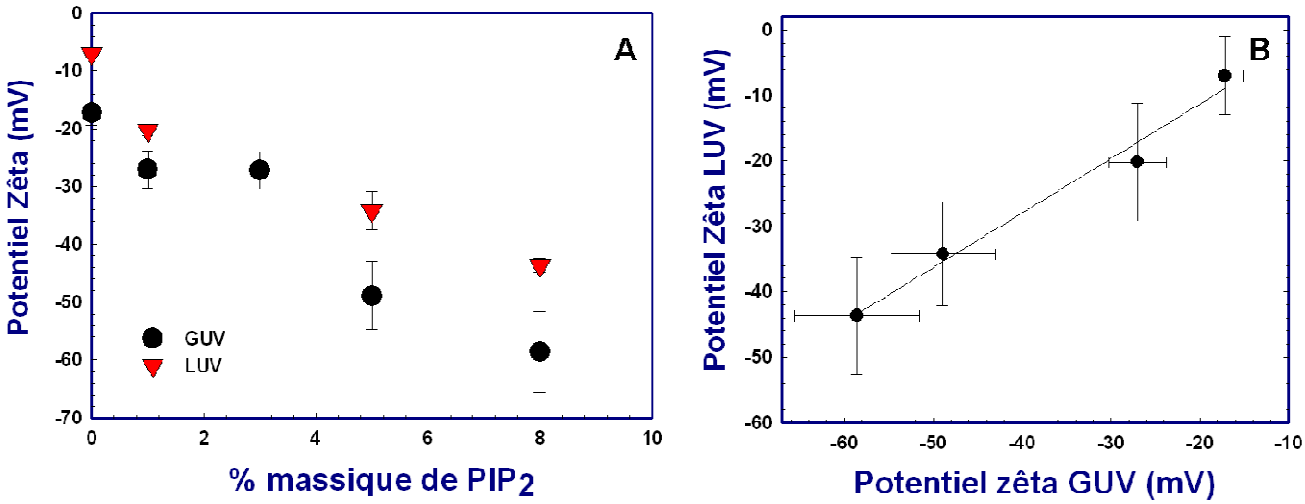



Fig III.A.10. (A) Potentiel zêta des LUV et des GUV en fonction du pourcentage de PIP2 et (B) le potentiel des LUV en fonction du potentiel des GUV, pour des pourcentages de PIP2 identiques.

Nous pouvons avancer deux hypothèses pour expliquer le décalage de potentiel ξ entre les LUV et les GUV. Les LUV sont des petits objets (100 nm) considérés indéformables. Les GUV peuvent être déformées quand elles se déplacent dans le champ électrique produit lors de la mesure du potentiel (*fig III.B.11*) (**Dimova et al. 2007; Riske et al. 2005; Riske et al. 2006**). Ainsi, dans la direction parallèle au champ, le rayon des vésicules est plus petit et il y a moins de forces de friction, ce qui permettrait à la GUV d'accroître leur mobilité électrophorétique, et donc leur potentiel zêta apparent.

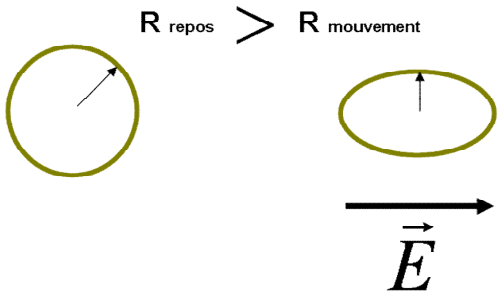



Fig III.B.11. Lorsqu'une vésicule est mise en mouvement en présence du champ électrique, elle se déforme. Cela a pour conséquence une diminution du rayon apparent de la GUV dans la direction du champ.

La seconde hypothèse est basée sur le fait que la membrane est en phase fluide. Sous l'action du champ électrique généré pour la mesure, il serait possible d'induire une réorganisation du PIP2 dans la membrane. En effet, le PIP2 étant négatif, il pourrait se réorganiser sous l'effet du champ électrique. Dans ce cas, la distribution du PIP2 ne serait plus homogène et la mesure du potentiel pourrait être faussée.

Cependant, lorsque nous traçons le potentiel des LUV en fonction du potentiel des GUV, nous obtenons une droite de pente proche de 1 (0.86), c'est-à-dire que les vésicules contenant du PIP2 semblent se comporter de façon similaire dans les deux types de systèmes (*fig III.A.10(B)*).

**La mesure du potentiel zêta ξ semble adaptée aux vésicules géantes.**

***III.B.1.f – Potentiel zêta des GUV***

Des mesures de potentiel zêta ont été effectuées sur les vésicules géantes. Sur la figure III.B.12 sont représentées les mesures de potentiel zêta faites 1 heure après l'électroformation, pour des GUV formées de DOPC ou de DOPC avec 15% en masse de cholestérol, et de différents pourcentages massiques de PIP2 dans le mélange de lipides initial. Pour des GUV composées de DOPC sans PIP2, le potentiel zêta se situe aux alentours de -20 mV. Le potentiel zêta devient plus négatif quand le pourcentage de PIP2 est augmenté. En présence de cholestérol, le potentiel zêta décroit linéairement avec le pourcentage massique de PIP2 jusqu'à une valeur de -60 mV environ. Ensuite, un plateau est atteint indiquant qu'il n'est pas possible d'insérer plus de 10% environ (en pourcentage massique) de PIP2 dans une GUV. D'une façon similaire, sans cholestérol, une décroissance du potentiel est également observée.
La décroissance de ξ indique que la charge des vésicules change et devient plus négative. Elle est attribuée à l'insertion du PIP2 dans la membrane des vésicules.
Le potentiel ξ étant susceptible d'évoluer pendant la période de stockage des GUV, il a également été mesuré 24h après la formation. Nous représentons sur la figure III.B.13 le potentiel ξ de vésicules composées de DOPC avec 15% de cholestérol (*fig III.B.13(A)*) ou sans cholestérol (*fig III.B.13(B)*), 1h après l'électroformation ou 24h après.
Les GUV composées exclusivement de DOPC et de PIP2 montrent, pour des pourcentages massiques de PIP2 supérieur à 1 %, un potentiel ξ qui augmente après 24h de stockage dans le tampon de gonflement. Ceci laisserait naïvement penser que ces GUV « perdent » du PIP2 dans la solution. Cependant des dosages de PIP2 (*cf III.B.3*) laissent supposer que ceci n'est pas la raison de l'augmentation du potentiel ξ. Les GUV qui contiennent du cholestérol à hauteur de 15% en masse présentent, en revanche, un potentiel stable pendant 24h.

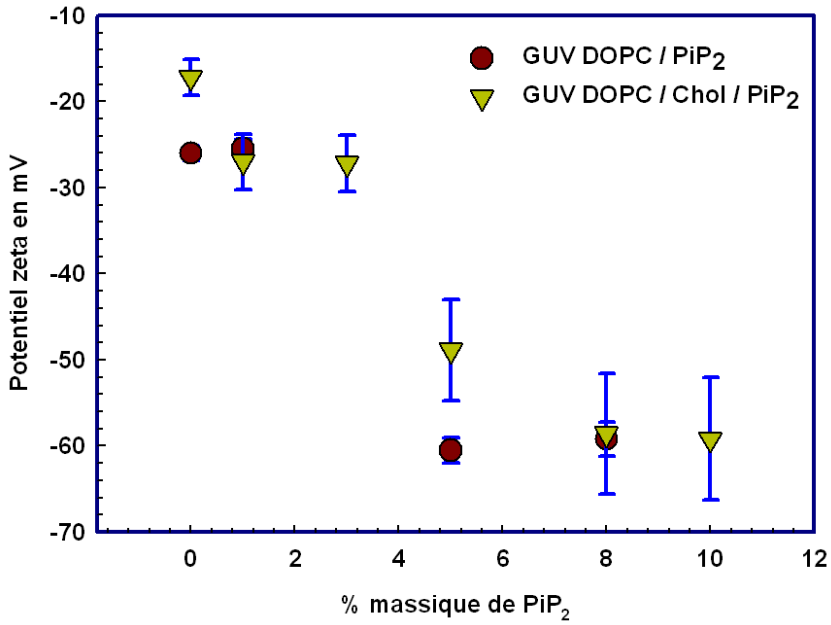



Fig III.B.12. Potentiel zêta de GUV 1h après l'électroformation en fonction du % massique de PIP2 dans le mélange initial de lipides, avec et sans cholestérol. Plus le pourcentage de PIP2 est élevé, plus le potentiel est négatif.

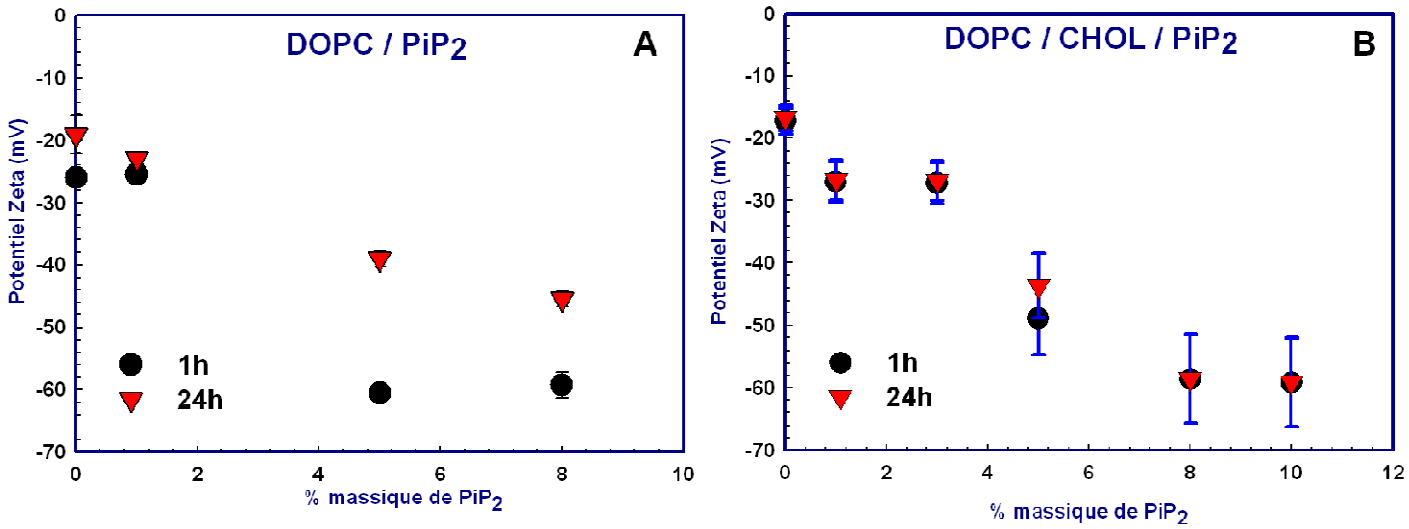



Fig III.B.13. (A) Evolution du potentiel zêta de GUV composées de DOPC et PIP2. (B) Evolution du potentiel zêta de GUV composées de DOPC, de cholestérol et de PIP2. Sans cholestérol, le potentiel évolue sur la période de stockage.

La présence de cholestérol dans le mélange ne semble pas favoriser l'incorporation du PIP2 mais semble donc les stabiliser. Certaines études indiquent que le cholestérol rigidifie les membranes lipidiques (**Henriksen et al. 2004; Kakorin et al. 2005**). Il est possible que les GUV qui contiennent du cholestérol soient plus résistantes, ainsi elles ne se détruisent pas.

Les mesures de potentiel ξ peuvent être répétées plusieurs fois sur les GUV avant qu'elles ne soient plus reproductibles. Néanmoins, une différence sensible se fait sentir : la mesure peut être répétée 5 à 6 fois sur les GUV ayant un pourcentage massique de PIP2 jusqu'à 5 %, mais seulement 3 à 4 fois maximum sur des GUV ayant un pourcentage de PIP2 au dessus de 5 %. Nous pensons que les GUV finissent par être détruites par la mesure. Ainsi, les GUV qui ont un fort pourcentage de PIP2 sont plus fragiles que les GUV ne contenant pas ou peu de PIP2. La présence ou l'absence de cholestérol ne modifie pas ce comportement.

Le POPS, un lipide négatif, a été utilisé comme contrôle de l'insertion d'un lipide chargé négativement. Des GUV ont été formées avec des quantités croissantes en POPS. Le potentiel zêta des GUV POPS a été mesuré. Afin de pouvoir comparer le potentiel zêta de GUV POPS et de GUV PIP2, nous avons tracé sur la figure III.B.14 les potentiels ξ avec comme axe des abscisses le pourcentage molaire de charges négatives dans le mélange de lipides initial. La charge du PIP2 est considérée comme étant -3 alors que la charge du POPS est de -1 (**Toner et al. 1988**)(*fig III.B.14*).

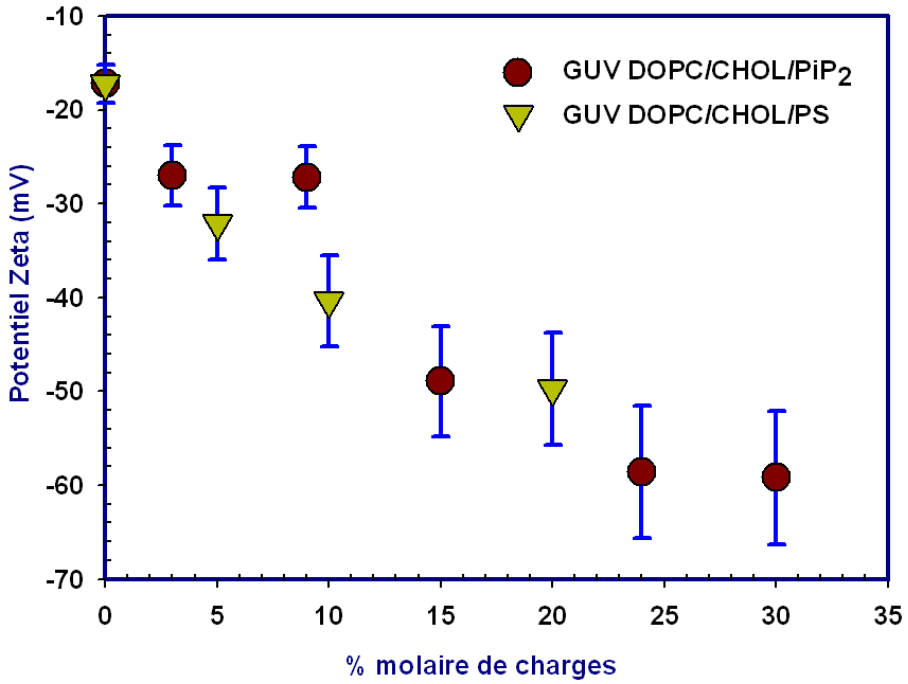



Fig III.B.14. Comparaison du potentiel zêta de GUV contenant du PIP2 et du POPS. L'évolution est la même, ce qui montre une dépendance similaire au pourcentage de charges négatives insérés dans la membrane.

Nous observons la même évolution du potentiel en fonction de la charge incorporée dans le mélange initial de lipides. En effet, les données obtenues avec le POPS et le PIP2 se superposent sur une même courbe. Plus les vésicules contiennent de lipides négatifs et plus le

potentiel est bas. Ceci confirme que le POPS et le PIP2 s'incorporent de la même façon dans les vésicules.
La saturation du potentiel intervient pour des pourcentages massiques de PIP2 de l'ordre de 8 % à 10 %, ce qui correspond à des pourcentages molaires de POPS de 20 % à 25 %. Ceci est en accord avec une autre étude qui montre que l'électroformation devient difficile voire impossible en présence de lipides chargés négativement au delà de 20 % en fraction molaire de ces lipides (**Rodriguez et al. 2005**).

Les GUV POPS seront utilisées comme contrôle négatif lors de l'interaction avec l'ezrine. Elles nous permettront de discriminer les effets électrostatiques des effets dus à une interaction stéréospécifique entre l'ezrine et le PIP2.

Nous avons également vérifié que l'incorporation de PIP2 fluorescent ne modifie pas le potentiel zêta des GUV : nous mesurons $\zeta = (-47.3 \pm 5.6)$ mV pour les GUV électroformées à partir d'un mélange composé de 4.9 % de PIP2, 0.1 % de FL-PIP2, et 15 % de cholestérol, et $\zeta = (-48.9 \pm 5.9)$ mV les GUV électroformées à partir d'un mélange composé de 5 % de PIP2 et de 15% de cholestérol

**La mesure de potentiel zêta sur les GUV est la première mesure vérifiant d'une façon directe l'incorporation du PIP2 non fluorescent par électroformation. Dans la suite, pour les expériences avec l'ezrine, nous choisissons la composition de GUV suivante : DOPC, avec 15% de cholestérol en masse (26 % en molaire) et 5% de PIP2 en masse (3.5% en molaire) car cette composition semble la plus robuste et elle n'est pas trop éloignée de la composition de la membrane plasmique qui contient 1 % à 2% de PIP2 en pourcentage molaire et de 20 % à 30 % de cholestérol en pourcentage molaire.**

## III.B.2 – Comportement des GUV dans un milieu salin

Le système biomimétique GUV est désormais caractérisé en termes d'incorporation du PIP2. Néanmoins, le but est de suivre l'interaction entre l'ezrine et des vésicules incorporant du PIP2. Dans cette partie, nous allons vérifier que les GUV sont stables dans un milieu qui convient à l'ezrine et à l'actine, c'est-à-dire un milieu salin, et un milieu qui contient ou non des ions divalents ($Mg^{2+}$ et $Ca^{2+}$).

Le PIP2 a déjà été incorporé dans les systèmes biomimétiques afin d'étudier l'effet de protéines comme la vinculine, la taline, la profiline ou N-WASP (**Niggli 2005; Liu et al. 2006**). De plus, d'autres protéines, comme l'annexine, lient le PIP2 d'une manière dépendante des ions $Ca^{2+}$ et $Mg^{2+}$ (**Gokhale et al. 2005**). Ces études nécessitent d'avoir les systèmes biomimétiques dans des tampons qui conviennent aux protéines, c'est-à-dire dans des milieux salins et/ou qui contiennent des ions divalents ($Ca^{2+}$ et $Mg^{2+}$). Dans le but de construire un système biomimétique complet d'attachement du cytosquelette d'actine à la membrane, il est important de connaitre le comportement des GUV dans les différents tampons utilisés.

Lorsque des GUV, formées par électroformation à basse force ionique, sont diluées dans un milieu salin, il peut y avoir plusieurs effets qui déstabilisent la vésicule : si les pressions osmotiques ne sont pas bien ajustées entre solution de gonflement et milieu de dilution les vésicules peuvent être détruites ou changer de forme d'une façon non contrôlée. Aussi, pour éviter cela, les omolarités de la solution de gonflement et du tampon ezrine neutralisé sont ajusté afin d'avoir des GUV légèrement dégonflées lorsqu'elles sont diluées dans le tampon contenant l'ezrine. De plus, les ions présents dans les tampons peuvent interagir avec les constituants de la membrane et induire des effets sur celle-ci. Une étude récente de Levental et collaborateurs (**Levental et al. 2009**) montre que le calcium est capable d'induire une agrégation du PIP2 dans une membrane.

Pour découpler les effets des solutions tampon des effets dus à l'interaction avec les protéines, nous allons examiner la stabilité des GUV contenant du PIP2 dans un milieu salin en absence et en présence d'ions divalents (calcium et magnésium).

### ***III.B.2.a – Stabilité des GUV dans un milieu salin sans ions divalents***

Lors de l'électroformation les vésicules sont formées dans du sucrose. Afin d'étudier l'interaction entre ezrine et GUV, il est nécessaire de mettre les GUV dans un milieu différent : un milieu physiologique ou un milieu ayant des conditions qui s'en approchent (pH 7.4 et environ 70 mM en sels monovalents). Ceci est nécessaire pour que la protéine soit fonctionnelle. Dans le souci de découpler les effets qui pourraient être dus au transfert des GUV dans un milieu salin, des effets dus à l'interaction de l'ezrine sur la membrane, il faut caractériser le comportement des GUV contenant du PIP2 dans ce milieu salin.

Lorsque les vésicules sont mises au contact de l'ezrine, elles sont diluées 10 fois dans le tampon de l'ezrine neutralisé. Un profil d'intensité du contour des GUV a été réalisé à

différents temps dans la solution saline. De ces profils d'intensité, nous déduisons le rapport $\sigma/IMean$ qui est représentatif de la répartition du PIP2 dans la membrane (voir chapitre II).

Dans la solution de gonflement, nous mesurons $\sigma/IMean = (10 \pm 2)\%$. Après 1h dans le tampon de l'ezrine neutralisé, $\sigma/IMean = (10 \pm 3)\%$ et après 2h nous avons $\sigma/IMean = (12 \pm 2)\%$ (mesures effectuées sur 160 vésicules).

Durant le temps typique de l'expérience, c'est-à-dire 2h à 3h, le rapport $\sigma/IMean$ évolue très peu. La distribution du PIP2 dans la membrane reste homogène dans le tampon de l'ezrine neutralisé. Après 3h dans ce tampon, les GUV se dégonflent et forment des agrégats de lipides.

En contraste de phase, les vésicules ne sont plus contrastées au bout de 1h à 2h, c'est-à-dire qu'elles perdent le sucrose intérieur : elles échangent avec le milieu dans lequel elles sont diluées. Une GUV dans le tampon de l'ezrine neutralisé est montrée sur la figure III.B.15.

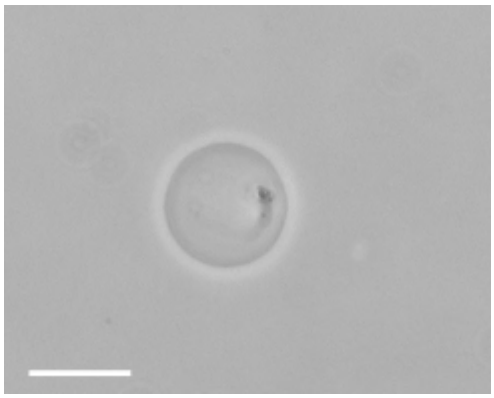


Fig III.B.15. Image en microscopie de contraste de phase d'une GUV après 60 minutes dans le tampon de l'ezrine neutralisé. Les GUV perdent leur milieu intérieur et elles ne sont plus contrastées. La barre représente 20 µm.

Nous définissons donc une durée maximale de 2h pour les expériences de contact avec l'ezrine et les expériences de lavage des GUV.

### ***III.B.2.b – Stabilité des GUV dans un milieu contenant des ions divalents***

Les GUV composées de DOPC de 15% de cholestérol et de 5% de PIP2 sont diluées dans une solution de glucose contenant des ions divalents. Nous attendons une dizaine de minutes puis analysons la déviation standard sur les GUV restantes pour quantifier l'effet du magnésium et du calcium sur des GUV contenant 4.9% de PIP2 et 0.1% de FL-PIP2.

La figure III.B.16 montre une projection sur un seul plan de plusieurs images obtenues en microscopie confocale. Nous observons deux GUV de composition identique en contact avec 90 µM de $Ca^{2+}$ ou 90 µM de $Mg^{2+}$. Lorsque nous ajoutons des ions divalents aux GUV, la répartition du PIP2 n'est plus homogène. On observe sur la membrane des zones riches en PIP2. De plus, beaucoup de vésicules éclatent même en présence de très peu d'ions.

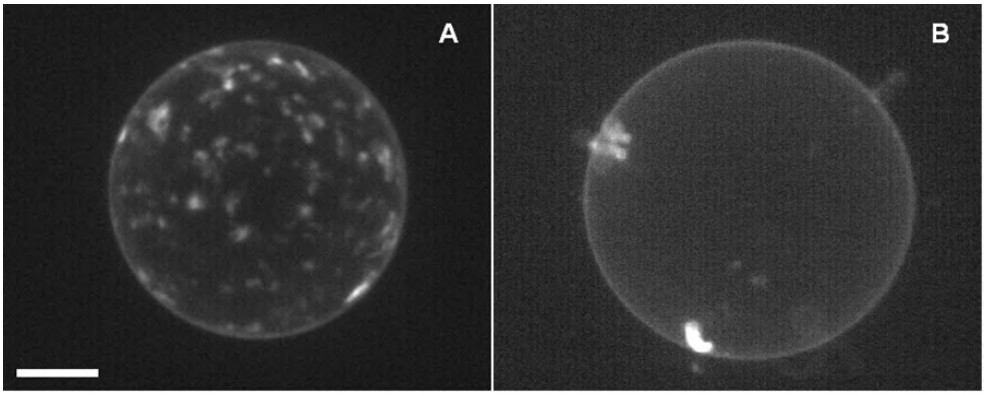



Fig III.B.16. (A) projection sur un plan de plusieurs images de microscopie confocale d'une GUV marqué avec du Fl-PIP2 en contact avec 90 µM de $Ca^{2+}$ et (B) projection sur un plan de plusieurs images de confocale d'une GUV marqué avec du Fl-PIP2 en contact avec 90 µM de $Mg^{2+}$.

Pour une concentration de l'ordre du mM pour le calcium et de l'ordre de 10 mM pour le magnésium, toutes les vésicules qui contiennent du PIP2 explosent en moins de 10 minutes. Pour des concentrations plus faibles d'ions divalents toutes les GUV n'explosent pas. Au bout de 10 minutes nous effectuons l'analyse de déviation standard sur les GUV restantes.

Nous traçons la valeur du rapport $\sigma/IMean$ en fonction de la concentration en ions divalents dans la solution. Les courbes $\sigma/IMean$ sont représentées sur la figure III.B.17 (pour une quinzaine de GUV dans chaque condition).

Plus la concentration en ions divalents est élevée, plus le marquage de la GUV est hétérogène. Les GUV gardent une répartition homogène du PIP2 jusqu'à une concentration de $Mg^{2+}$ d'environ 20 µM et deviennent hétérogènes pour des concentrations plus élevées. Pour des concentrations en $Mg^{2+}$ supérieures à 1mM, la plupart des vésicules explosent.

En présence de calcium, la sensibilité des GUV est accrue. En effet, dès l'ajout de quelques micromolaires d'ions, des hétérogénéités de répartition apparaissent. Au dessus de 100 µM, il ne reste quasiment plus de vésicules.

Afin de voir si les ions divalents interagissent toujours avec la membrane des GUV lorsqu'ils sont complexés avec leurs chélateurs respectifs, nous ajoutons à la solution de glucose, qui

contient les ions divalents, 4 mM d'EGTA (chélateur de calcium) ou 4 mM d'EDTA (chélateur de magnésium). Puis nous diluons des GUV contenant 5% de PIP2 dans cette solution. Dans ce cas les GUV restent homogènes sur des durées de 2 heures, avec un rapport $\sigma/IMean = (11 \pm 3)\%$. L'ajout de chélateurs permet de capter les ions divalents qui n'interagissent alors plus avec la membrane des GUV.

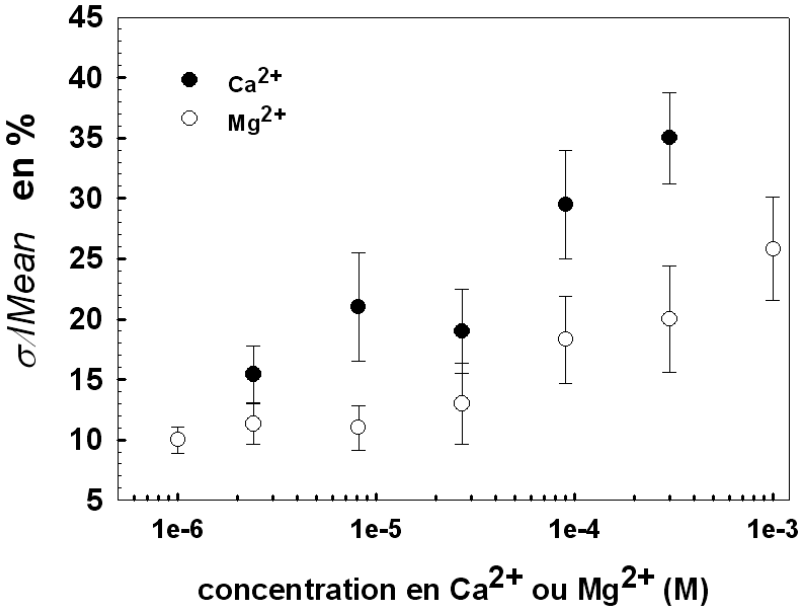



Fig III.B.17. Analyse de déviation standard de GUV marquées en fluorescence par le FL-PIP2. Le rapport $\sigma/IMean$ est tracé en fonction de la concentration d'ions calcium ou d'ions magnésium. Plus les concentrations en ions sont importantes, plus la membrane est hétérogène.

Nous concluons de ces deux types d'expériences que les GUV sont stables pendant quelques heures dans le tampon ezrine neutralisé, c'est-à-dire que la répartition du PIP2 reste homogène et que les vésicules gardent leur forme sphérique. Néanmoins les GUV échangent leur milieu intérieur. Des essais ont été effectués dans le tampon F de l'actine : la répartition homogène du PIP2 est également conservée. En effet, même sil tampon F contient quelques millimolaires d'ions divalents, la chélation par l'EGTA et l'ATP est suffisant et permet aux ions de ne pas interagir avec la membrane de la vésicule.

Dans une solution de glucose contenant des ions divalents, le rapport $\sigma/IMean$ évolue : le marquage à l'aide de FL-PIP2 devient hétérogène. Les ions interagissent avec le PIP2 de la membrane et induisent un partitionnement de celui-ci. Ce résultat est en accord avec une étude de Toner et al. (**Toner et al. 1988**) qui montre une interaction entre le PIP2 et les ions calcium et magnésium.

**Les ions calcium et magnésium induisent des hétérogénéités de répartition du PIP2 dans la membrane. Dans la suite des expériences, nous ajoutons toujours quelques milli-molaires d'EGTA et / ou d'EDTA dans les solutions afin d'éviter aux ions divalents d'interagir avec le PIP2 et induire des artefacts de répartition.**

## III.B.3 – Visualisation des interactions entre ezrine et GUV

### *III.B.3.a – Choix des conditions expérimentales*

Pour avoir un effet maximal de l'ezrine sur les vésicules géantes, il est important que le maximum de PIP2 sur la GUV soit en interaction avec l'ezrine.
Si l'on se réfère aux travaux sur les LUV, la liaison de l'ezrine a une membrane contenant du PIP2 peut être décrite avec une constante d'association *K* pour une interaction de type 1 : 1.

$$K = \frac{1}{K_d} = \frac{[PiP_2]_{lié}}{[ez]_{libre}[PiP_2]_{libre}} \quad (31)$$

Où $[PIP2]_{lié}$ et $[PIP2]_{libre}$ sont les concentration en PIP2 libre et liée à l'ezrine et $[ez]_{libre}$ est la concentration en ezrine libre. De plus la loi de conservation de la masse impose : $[PIP2]_{total} = [PIP2]_{lié} + [PIP2]_{libre}$.L'interaction de type 1 : 1 impose $[PIP2]_{lié} = [ez]_{liée}$.
Nous déduisons de l'équation *(31)* et de la conservation de masse un polynôme de degré deux dont la solution est :

$$[PIP_2]_{lié} = \frac{([PiP_2]_{total} + [ez]_{totale} + K_d) - \sqrt{([PiP_2]_{total} + [ez]_{totale} + Kd)^2 - 4[ez]_{totale}[PiP_2]_{total}}}{2} \quad (32)$$

Des quantités initiales de PIP2 et d'ezrine (respectivement $[ez]_{totale}$ et $[PIP2]_{total}$), il est possible d'estimer le pourcentage de PIP2 lié.

Les pourcentages de liaison de l'ezrine et du PIP2 sont calculés pour différentes concentrations d'ezrine sur une gamme 0.5 µM à 15 µM (correspondant à la concentration maximale obtenue lors de la préparation de la protéine) et pour une constante d'affinité $K_d$ fixée à 5 µM (**Blin et al. 2008**)). La figure III.B.18 représente le pourcentage de PIP2 lié en fonction de la concentration en lipide total pour une fraction massique en PIP2 de 5 %.

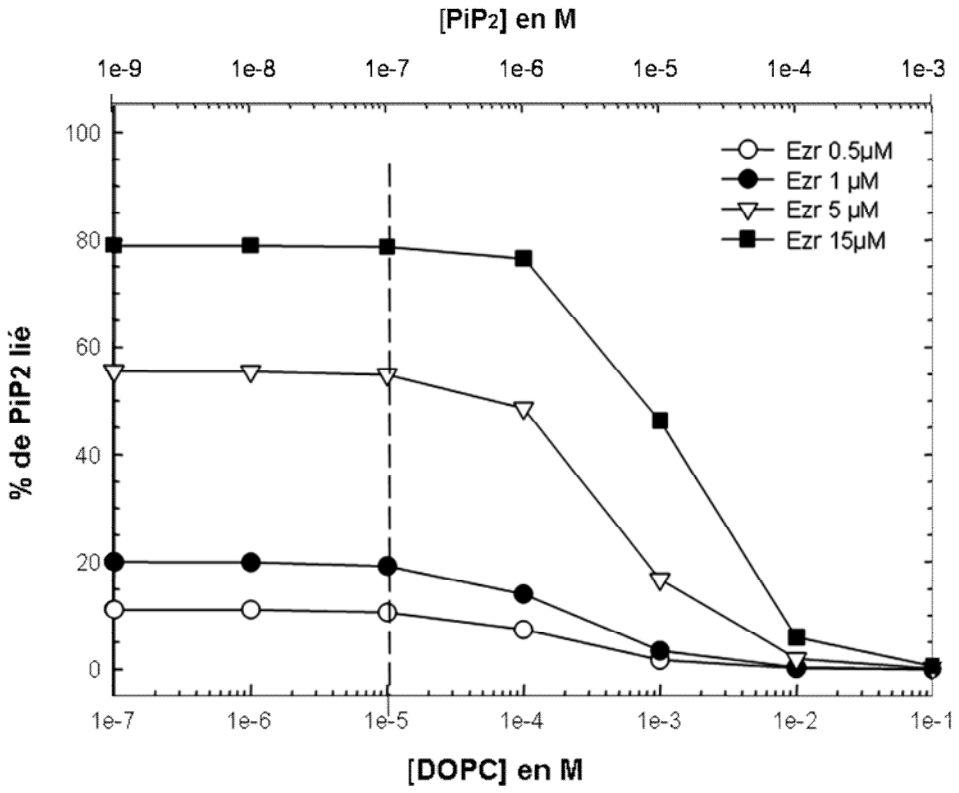



Fig III.B.18. Courbes qui représentent le pourcentage de PIP2 lié en fonction de la concentration de lipide. La concentration des GUV dans nos conditions expérimentales, après dilution 10 fois dans la solution d'ezrine, est représentée par le trait en pointillé. La concentration finale lors du contact GUV / ezrine est ~$10^{-5}$ M.

La concentration en lipide lors du contact ezrine / GUV PIP2 est estimée à $10^{-5}$ M. D'après la courbe représentée en III.B.18, il faut que le contact entre GUV 5% PIP2 et ezrine se fasse à concentration en ezrine élevée pour avoir le maximum de PIP2 lié. Dans des conditions où les GUV sont en contact avec de l'ezrine à une concentration de l'ordre de 15 µM, 80% du PIP2 accessible sur la GUV serait lié et seulement 4 % de l'ezrine est liée.
Nous avons donc choisi de travailler à une concentration d'ezrine WT de 15 µM environ et d'ezrine fluorescente, utilisée comme traceur, à une concentration de 0.2 µM.

### ***III.B.3.b – Quantification des interactions entre ezrine et GUV***

Les GUV sont stables dans le tampon d'ezrine neutralisé pendant 2h au moins. Il a déjà été montré que l'ezrine interagit avec le PIP2 lorsque celui-ci est inséré dans des LUV (**Blin et al. 2008**), des bicouches supportées (**Janke et al. 2008; Herrig et al. 2006**) et des GUV obtenues par gonflement spontanée (**Takeda et al. 2006**).

Les GUV contenant 5% de PIP2 en masse sont introduites dans la chambre contenant l'ezrine WT à des concentrations toujours comprises entre 14 µM et 25 µM et avec une concentration en ezrine fluorescente de 0.2 µM (ezrine-Alexa488 ou ezrine-Alexa546).
En microscopie confocale, seules les GUV contenant du PIP2 se marquent en fluorescence. Des images obtenues pour des GUV de compositions différentes sont montrées sur la figure III.B.19.

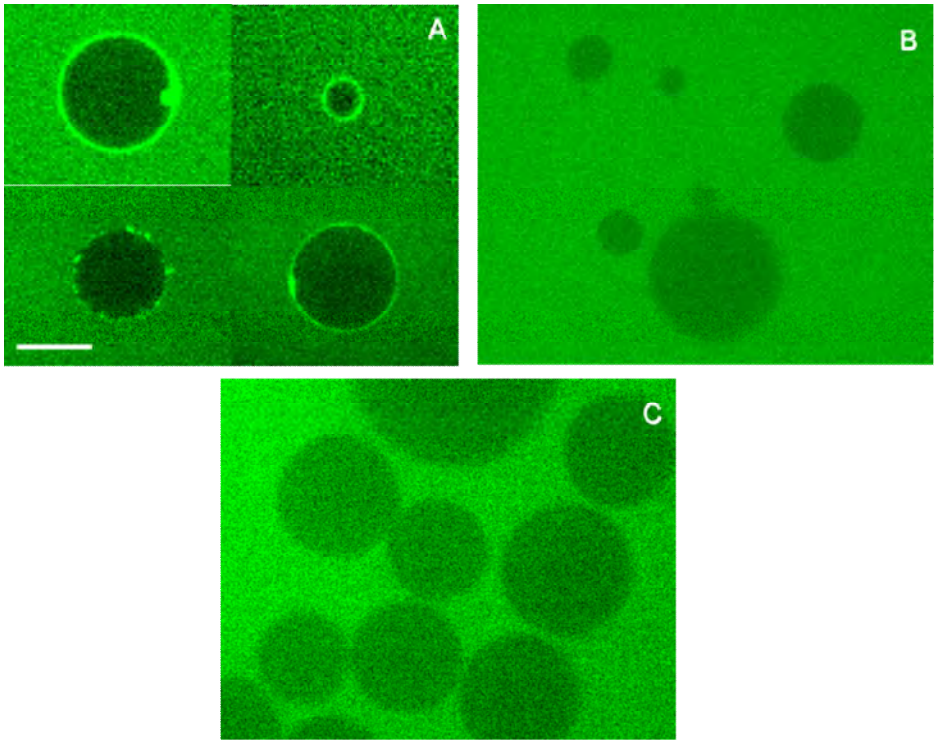



Fig III.B.19. Vésicules dans une solution d'ezrine fluorescente, (A) GUV 5% PIP2, (B) GUV DOPC sans PIP2 et (C) GUV 15% POPS. La barre représente 10 µm.

Les GUV qui contiennent du PIP2 sont les seules dont la membrane est marquée en fluorescence par l'ezrine (A). Lorsque les GUV ne contiennent pas de PIP2 ou contiennent 15% de POPS en masse, les vésicules ne sont pas marquées (B et C). Les premières GUV qui se marquent en fluorescence sont toujours observées une dizaine de minutes après la mise en contact avec la protéine. Les GUV sont observées pendant au moins 1h après la mise en contact avec l'ezrine.

Un profil radial d'intensité est réalisé sur les vésicules en contact avec l'ezrine fluorescente. Le profil radial moyen, mesuré sur 14 GUV issues de 3 expériences différentes, est montré sur la figure III.B.20. Lorsque les GUV sont marquées en fluorescence, nous avons un pic d'intensité au niveau de la membrane de celles-ci. Nous définissons une GUV marquée à la

membrane quand le pic d'intensité sur la membrane est supérieur d'au moins 15% à l'intensité à l'extérieur de la GUV. L'intensité du pic varie de 1.15 à 2 fois l'intensité de la solution fluorescente.

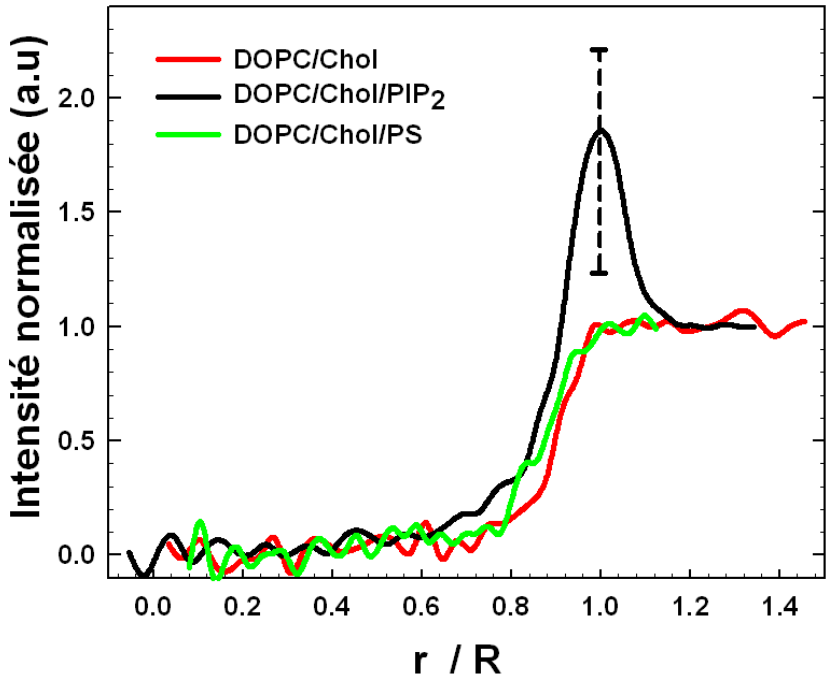



Fig III.B.20. Profil d'intensité radial de GUV en contact avec de l'ezrine. La barre verticale en pointillés représente les valeurs minimales et maximales mesurées pour les GUV dont la membrane est devenue fluorescente après contact avec l'ezrine.

Lorsque les GUV 5% PIP2 ne contiennent pas de cholestérol, seule 6% des vésicules sont marquées par l'ezrine. Lorsque les GUV 5% PIP2 contiennent du cholestérol à hauteur de 15% en masse, 25% des vésicules sont marquées en moyenne (*tableau III.G*). Une moyenne sur environ 650 GUV issues d'une dizaine d'expériences de contact et de 7 préparations d'ezrine différentes a été réalisée. Aussi, la composition des GUV apparaît importante pour l'interaction.

La présence de l'analogue fluorescent du PIP2 ne semble pas avoir d'influence. En effet, lorsque des GUV composées de 15% cholestérol, 4.9% PIP2 et 0.1% FL-PIP2, sont mises en contact avec de l'ezrine-Alexa546, le pourcentage moyen de GUV marquées par l'ezrine et de 25 % également.

Dans le souci de vérifier que les deux types d'ezrine fluorescentes (Alexa546 et Alexa488) ont le même comportement, nous réalisons une expérience de contact entre des GUV 5% PIP2 et 15% cholestérol et un mélange les deux types d'ezrine fluorescentes. Nous avons 25% de

marquage des vésicules dans chacun des canaux correspondant aux deux types d'ezrine fluorescente. Dans 100% des cas, les mêmes GUV sont marquées par les deux ezrines fluorescentes. Un exemple de double marquage par les ezrines fluorescentes est donné sur la figure III.B.21. Dans les deux cas, la hauteur du pic d'intensité sur les profils radiaux normalisés est comparable.

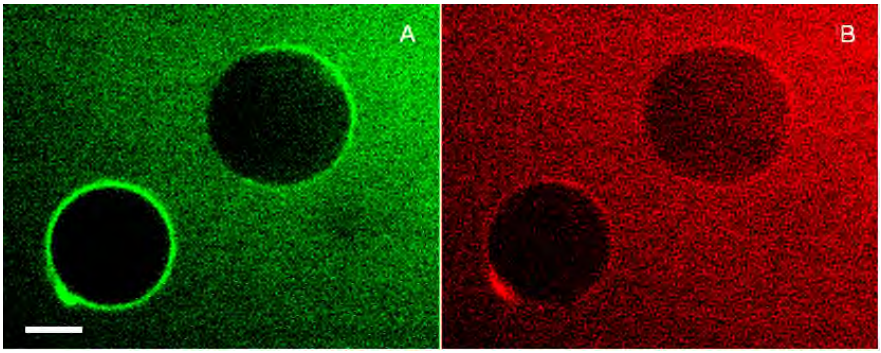



Fig III.B.21. GUV marquées par (A) de l'ezrine-Alexa488 et (B) de l'ezrine-Alexa546. la barre représente 10 µm.

Le tableau III.G synthétise les pourcentages de GUV marquées par l'ezrine pour chaque composition.

| **Compositions** | **Nombre de GUV comptées** | **% de marquage** |
|---|---|---|
| DOPC/Chol (85 : 15) | 222 | 0 |
| DOPC/Chol/POPS(70 : 15 : 15) | 110 | 0 |
| DOPC/Chol/PIP2(80 : 15 : 5) | 637 | 25 |
| DOPC/Chol/PIP2/Fl-PIP2(80 : 15 : 4.9 : 0.1) | 51 | 22 |
| DOPC/PIP2(95 : 5) | 329 | 6 |

Tableau III.G. Pourcentage de GUV marquées par l'ezrine en fonction de leurs compositions.

Lorsque nous mettons en contact des GUV 5% PIP2 15% cholestérol marquées à l'aide du FL-PIP2, avec de l'ezrine-Alexa546, nous observons une colocalisation de zones de fortes concentrations en PIP2 et de zones de fortes concentration en ezrine (*fig III.B.22*).

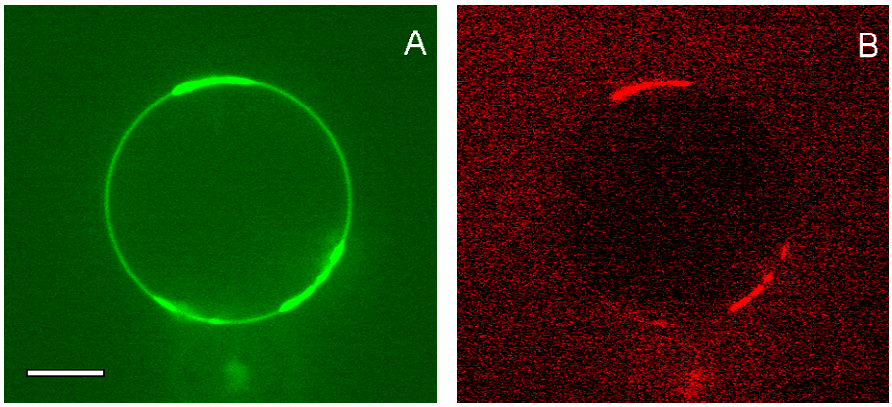



Fig III.B.22. GUV 5% PIP2 marquée par (A) le FL-PIP2 et (B) l'ezrine-Alexa546. La barre représente 10 µm.

Nous avons quantifié l'hétérogénéité de la membrane en présence d'ezrine. Sur la figure III.B.23, nous avons représenté $\sigma/IMean$ pour des GUV en contact avec l'ezrine. Le rapport $\sigma/IMean$ mesuré pour l'ezrine sur la membrane est $\sigma/IMean = (30.5 \pm 14.7)\%$. Cela montre une distribution hétérogène de celle-ci. De façon similaire, $\sigma/IMean$ du FL-PIP2 est de $\sigma/IMean = (31.6 \pm 16.6)\%$ indiquant qu'il est aussi distribué de manière hétérogène dans la membrane. Or en l'absence l'ezrine au contact des GUV, le rapport $\sigma/IMean$ mesuré pour le FL-PIP2 est $\sigma/IMean = (10 \pm 2)\%$, indiquant une répartition homogène de celui-ci. Ainsi les hétérogénéités de répartition du FL-PIP2 ne sont présentes qu'en présence de la protéine.

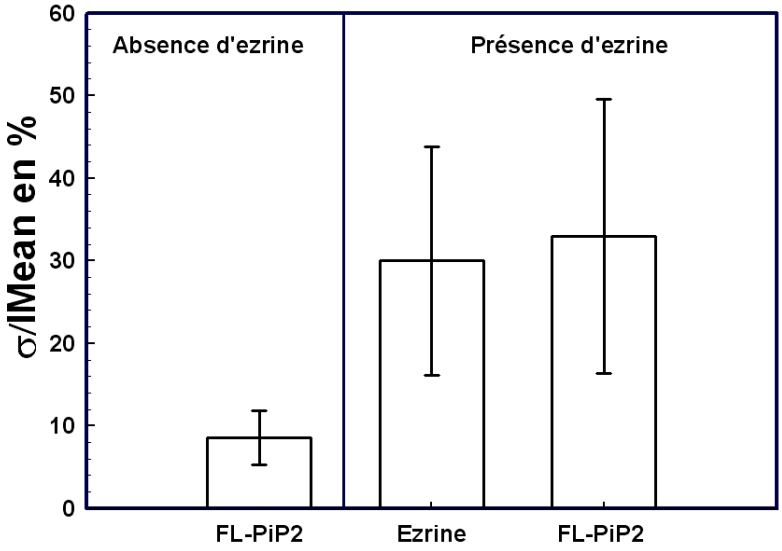



Fig III.B.23. Analyse de déviation standard pour des vésicules contenant du FL-PIP2, mises en présence d'ezrine (à droite) en comparaison avec des vésicules seules (à gauche). En présence d'ezrine, la répartition du FL-PIP2 et celle de l'ezrine sont similaires.

Il y a au moins 80% des vésicules marquées par l'ezrine pour lesquelles le rapport de l'ezrine fluorescente à la membrane $\sigma/IMean$ > 15%, valeur seuil que nous avions considérée pour des GUV homogènes (voir chapitre II). L'ezrine forme donc des agrégats sur la membrane des GUV et induit une réorganisation du PIP2 dans la membrane.

Lorsque les GUV sont marquées par l'ezrine fluorescente, nous mesurons que, sur le profil radial, le pic d'intensité au niveau de la membrane est au maximum deux fois plus intense que la solution d'ezrine, indiquant que la concentration d'ezrine est localement deux fois plus importante. En analysant les images de GUV marquées par l'ezrine fluorescente, nous pouvons estimer la quantité d'ezrine présente sur la membrane en se basant sur la géométrie du problème. Par microscopie confocale, une zone fluorescente ayant la forme d'une couronne est observée (*fig III.B.24*).

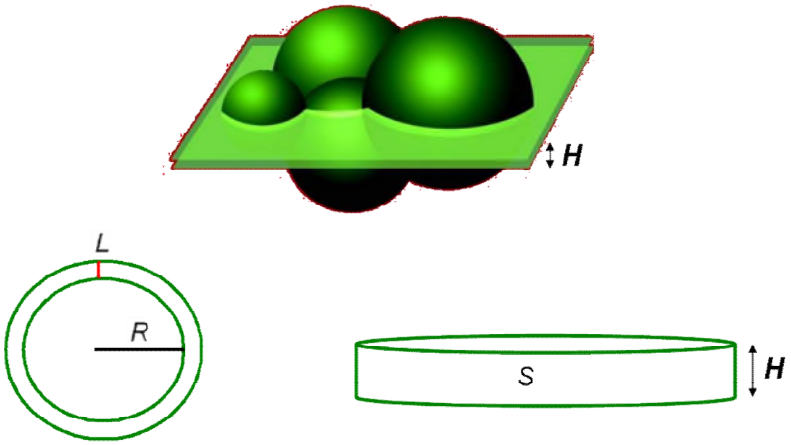



Fig III.B.24. Observation des GUV en microscopie confocale. Nous récupérons un signal de fluorescence du plan équatorial des GUV. Le signal est confiné dans une couronne qui représente la forme de la GUV dans le plan et la résolution en *z* du microscope dans la direction perpendiculaire au plan. *R* est le rayon de la GUV, *L* est l'épaisseur de la membrane fluorescente et *H* est la taille du plan dans la direction *z*.

Le volume de cette couronne est :

$$V = \pi H L^2 \times (1 + \frac{2R}{L}) \quad (33)$$

La surface interne de cette couronne est :

$$S = 2\pi H R \quad (34)$$

Où *H* est la hauteur de résolution du microscope qui est d'environ 1 µm, *L* est l'épaisseur apparente de la membrane fluorescente qui est mesurée à 1 µm également et *R* est le rayon de la GUV (une dizaine de µm).

L'intensité normalisée égale à 1 correspond à une concentration d'ezrine de 15 µM environ. Lorsque l'intensité normalisée est supérieure à 1 cela correspond à des concentrations supérieures à 15 µM. Avec la concentration et le nombre d'Avogadro, le nombre de molécules d'ezrine liée à la membrane est calculée (différence entre le nombre de molécule dans la couronne et le nombre de molécules en solution).

$$N_{ezrineliée} = [I_{Memb} - I_{Norm}] \times [Ez]_{Solution} \times V \times N_A \qquad (35)$$

Où $N_{ezrineliée}$ est le nombre, dans la couronne d'observation de volume $V$, d'ezrine liées à la membrane, $N_A$ est le nombre d'Avogadro, $[Ez]_{Solution}$ est la concentration d'ezrine en solution (environ 15 µM), $I_{Memb}$ est l'intensité de fluorescence mesurée de la membrane et $I_{Norm}$ est l'intensité de fluorescence mesurée de la solution d'ezrine.

En supposant, que l'ezrine forme une monocouche de protéines sur la membrane, Pour une GUV de rayon 10 µm, le volume $V$ est de $6.5.10^{-17}.m^3$, la surface $S$ de la couronne d'observation est de 60 µm², le nombre d'ezrine liée à la membrane $N_{ezrineliée}$ est de l'ordre du millier de molécule. Une densité moyenne de molécules d'ezrine sur la surface de la GUV peut être calculée comme étant le nombre d'ezrine dans la couronne $N_{ezrineliée}$ divisé par la surface $S$ de la couronne d'observation.
Les densités surfaciques d'ezrine sur la membrane sont de l'ordre de 20 molécules d'ezrine par µm² pour une concentration d'ezrine 2 fois plus élevée au contact de la membrane, et de 1.5 molécules d'ezrine par µm² pour une concentration 1.15 fois plus élevée au voisinage de la membrane

Les quantités d'ezrine qui se lient à la membrane des GUV sont compatibles avec la quantité maximale d'ezrine pouvant se lier à une membrane. En effet, la surface du domaine FERM interagissant sur la membrane est de 30 nm² environ, donc sur un µm², au maximum, il est possible d'avoir 33 333 molécules d'ezrine. Lorsque les GUV sont marquées en fluorescence par l'ezrine, cela correspond à une faible quantité d'ezrine se liant à la membrane : nous sommes loin d'une monocouche d'ezrine à la membrane et d'un empilement compacte.

### ***III.B.3.c – Discussion sur le fait que toutes les GUV ne sont pas marquées par l'ezrine***

Nous avons mis en évidence que l'ezrine interagit avec les GUV mais que, au maximum, 25% des GUV apparaissent fluorescentes. La présence de cholestérol conduit à augmenter le nombre de vésicules qui apparaissent marquées en fluorescence.

Nous avons donc cherché à comprendre les raisons qui pourraient expliquer ces observations. Dans ce but, plusieurs questions ont été soulevées :

**i -** le PIP2 pourrait-il sortir de la membrane lors de l'interaction ezrine/PIP2 ?

**ii -** la population de GUV pourrait-elle être hétérogène ?

**iii -** le fluorophore Alexa488 pourrait il jouer un rôle ?

**iv -** comment se situent nos résultats au vu de ceux de la littérature ?

**i )** Pour vérifier que les GUV ne libèrent pas de PIP2 dans le tampon de l'ezrine neutralisé lors du contact avec la protéine, nous avons réalisé un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Le principe est le même que celui du Western Blot : nous détectons une espèce à l'aide de ses anticorps spécifiques. Une enzyme couplée à un anticorps secondaire produit ensuite une coloration. Les GUV ont été centrifugées et le PIP2 dans le culot a été quantifié par ce test. Dans le surnageant nous avons dosé la quantité de PIP2 présente de la même manière. Nous voyons dans la figure III.B.25 la quantité de PIP2 dans le surnageant exprimée en pourcentage de PIP2 contenu au départ dans les GUV.

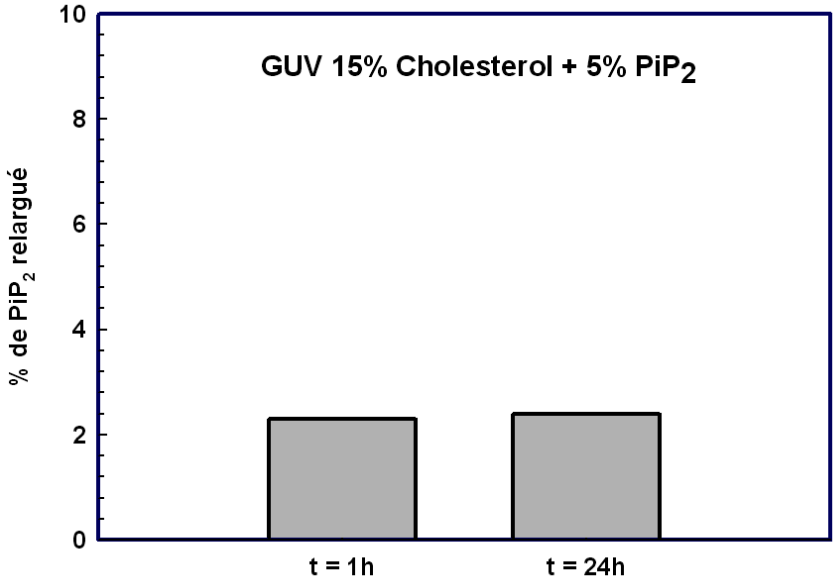



Fig III.B.25. Pourcentage de PIP2 relargué par rapport au PIP2 incorporé dans les GUV. Une mesure a été faite 1h après l'électroformation et 24 h après.

Lors du contact entre l'ezrine et les GUV, la concentration en lipides est de l'ordre de $10^{-5}$ M. Avec des GUV composées de 5 % de PIP2, on peut donc estimer la concentration de PIP2 totale à 0.5 µM. Le dosage ELISA montre que seulement 3 % du PIP2 est relargué, soit

environ 10 nM. Cette perte est trop faible pour pouvoir être détectée par mesure de potentiel zêta.
Une telle concentration n'est pas suffisante pour interagir avec toute l'ezrine présente en solution (15 µM) et empêcher celle-ci d'interagir avec les GUV. La présence de PIP2 en solution n'explique pas pourquoi seulement 25% des GUV sont marquées.
Les expériences de dosage ELISA indiquent également que l'augmentation du potentiel zêta de GUV sans cholestérol observé après 24h n'est pas dû au passage du PIP2 en solution. Après 24h les GUV sans cholestérol, les GUV présentent de nombreux défauts et ressemblent plus à des agrégats de lipides. La remontée du potentiel zêta pourrait être liée à cette présence d'agrégats lipidiques.

**Les GUV libèrent peu de PIP2 dans le tampon de l'ezrine neutralisé, environ 10 nM.**

**ii )** Concernant la question de l'hétérogénéité de la population de GUV, la mesure du potentiel zêta semble plutôt indiquer que cette population est homogène pour son incorporation de PIP2.

**iii )** La question de l'influence du fluorophore peut être posée au vu de ce qui est déjà décrit dans la littérature. En effet, les fluorophores peuvent jouer un rôle dans une interaction et induire un artefact de marquage (**Gambhir et al. 2004**). C'est pourquoi nous avons précédemment vérifié par co-sédimentation que les constantes d'équilibre pour de l'ezrine WT et de l'ezrine fluorescente pour des LUV contenant du PIP2 sont similaires (**Blin et al. 2008**). Ainsi, la constante de dissociation $K_d$ entre l'ezrine WT et les LUV-PIP2 est de (5.9 $\pm$ 0.7) µM et celle entre l'ezrine-Alexa488 et ces mêmes LUV est de (4 $\pm$ 0.5) µM.
Le fait que l'ezrine fluorescente et l'ezrine WT ont la même affinité pour le PIP2 a d'ailleurs permis d'utiliser l'ezrine fluorescente en spectroscopie de fluorescence corrélée (FCS) pour mesurer le $K_d$ par une autre méthode que la co-sédimentation (**Blin et al. 2008**).

**L'ezrine WT et les ezrines fluorescentes ont la même affinité pour le PIP2**.

Enfin, il est possible que des GUV soient très faiblement marquées par l'ezrine. Tel que nous l'avons défini, les GUV sont marquées quand l'intensité de fluorescence de la membrane dépasse de 15 % l'intensité de la protéine en solution, ce qui peut conduire à une sous-

évaluation de la quantité réelle de GUV marquées. Néanmoins, nous ne pensons pas que cela explique le phénomène.

**iv )** Le fait que seulement 25% des GUV soient marquées par l'ezrine n'est pas si surprenant à la vue de la littérature. Il existe plusieurs études où les effets ne sont présents que pour une partie de la population de vésicules lipidiques. Heuving et al. (**Heuvingh et al. 2007**) montrent que seulement 18% de GUV sur lesquelles est ajoutée ARF-1 présentent une comète d'actine. Takeda et al. (**Takeda et al. 2006**) montrent que seulement 30% des vésicules ont des pores lorsqu'elles interagissent avec l'ezrine et ils observent une colocalisation entre ezrine et patchs sur la membrane seulement dans 30% des cas également.

### ***III.B.3.d –Formation d'agrégats d'ezrine et réorganisation du PIP2 à la membrane***

Les observations supportent le fait que l'ezrine serait capable de réorganiser le PIP2 au sein de la membrane. En effet, avec l'analyse de déviation standard effectuée sur des GUV en contact avec l'ezrine, il apparait que le rapport $\sigma/IMean$ est trois fois supérieur au rapport $\sigma/IMean$ d'une GUV homogène. Il existe des agrégats d'ezrine sur la membrane qui colocalisent avec des zones riches en PIP2. Ces résultats sont en contradiction avec les résultats précédemment obtenus sur les LUV par des expériences d'extinction de fluorescence (**Blin et al. 2008**), où il avait été montré que l'ezrine n'induit pas la formation d'agrégats de PIP2.

Les observations de la répartition de l'ezrine sur les GUV sont appuyées par la littérature sur des membranes planes. Il a déjà été observé par Herrig et collaborateurs (**Herrig et al. 2006**) en microscopie de force atomique un tel effet sur des membranes supportées contenant 3% de PIP2 en interaction avec de l'ezrine. Les agrégats de protéines sur la surfaces sont vus comme des interactions protéine / protéine.

Les LUV sont des petits objets (100 nm) comparés aux GUV (quelques microns) et les deux systèmes ne sont pas équivalents : dans le cas des LUV, la membrane est fortement courbée, alors qu'elle peut être considérée comme plane dans le cas des GUV. Il est possible que les interactions protéine / protéine dont font état Herrig et collaborateurs (**Herrig et al. 2006**) ne soient pas favorisées par une membrane courbée.

**L'ezrine réorganise la distribution du PIP2 dans les membranes planes, de type GUV mais pas dans les membranes fortement courbées, de type LUV. Il existe des agrégats d'ezrine sur la membrane des GUV.**

Il est à noter qu'une autre étude (**Takeda et al. 2006**) rapporte la formation de pores dans une membrane de GUV en présence d'ezrine (à 15 µM). La membrane contenait de la phosphatidylcholine et du phosphatidylglycérol (un lipide négatif). De façon intéressante, ces auteurs observent que la présence de 10% de PIP2 abolit complètement la formation des pores. Nos expériences confirment que l'ezrine qui interagit avec une membrane contenant du PIP2 à hauteur de 5% en masse n'est pas capable d'induire la formation de pores.

***III.B.3.e – Irréversibilité de la liaison ezrine / GUV***

D'après l'étude sur les LUVs réalisée au sein du laboratoire, la constante d'affinité de l'ezrine pour les LUV-PIP2 est de l'ordre de 4 µM à 6 µM (**Blin et al. 2008**). Il devrait donc exister un équilibre réversible entre les protéines d'ezrine qui interagissent avec le PIP2 dans la membrane des GUV et les protéines d'ezrine qui sont en solution. Selon la figure III.A.18, lorsque la concentration d'ezrine autour de la GUV diminue d'un facteur 144, le pourcentage de PIP2 lié devrait diminuer de 80% à quelques pourcents. De la même façon le pourcentage d'ezrine liée doit passer de 0.09 % à une fraction infinitésimale. Cette diminution du nombre de molécules d'ezrine fluorescente devrait se traduire par une forte chute de l'intensité de fluorescence de la GUV.

Pour tester cette hypothèse, des expériences de dilution des GUV au contact de l'ezrine ont été réalisées, la concentration d'ezrine initiale étant toujours comprise entre 15 µM et 25 µM (voir chapitre II). Lors de la dilution, la concentration d'ezrine finale sera de 100 nM à 173 nM d'ezrine pour 1 nM d'ezrine fluorescente.

Les vésicules sont suivies en microscopie confocale sur une période de 2 à 60 min après la dilution. Une image de GUV 5% PIP2 marquée avant la dilution et toujours marquées 45 minutes après la dilution est montrée sur la figure III.B.26.

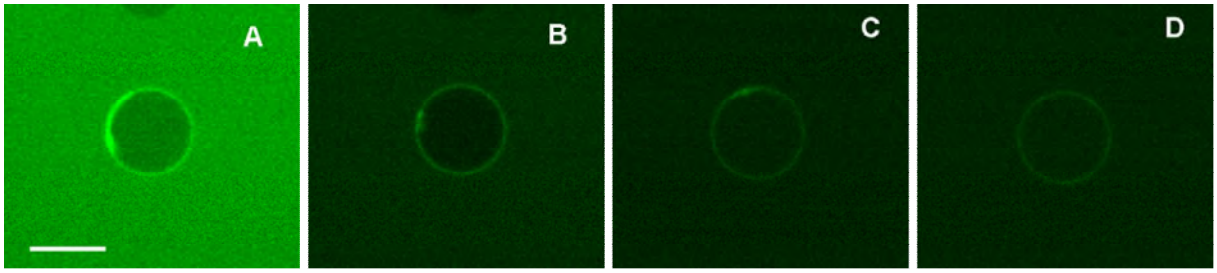



Fig III.B.26. GUV 5% PIP2 marquée par l'ezrine fluorescente observée : (A) avant la dilution ; (B) 5 min après la dilution ; (C) 20 min et (D) 45 min. La barre représente 10 µm.

60 minutes après la dilution, toutes les GUV qui étaient marquées initialement le sont encore.

Pour pouvoir évaluer la perte de protéines fluorescentes de la membrane de la GUV, nous avons réalisé une expérience contrôle où nous avons suivi l'évolution de l'intensité de fluorescence de la d'une bille de polystyrène ayant des groupements carboxyles, sur laquelle est adsorbée l'ezrine fluorescente.

Pour cette analyse, l'intensité de fluorescence moyenne de 5 points répartis le long du contour de la membrane (notée $I_{\text{init}}$) et l'intensité de fluorescence de la solution après la dilution loin de la membrane de la GUV ou de la bille (notée $I_{sol}$) sont mesurées.
L'intensité normalisée s'exprime alors : $I_{\text{NORM}} = (I - I_{\text{sol}})/(I_{\text{init}} - I_{\text{sol}})$.
La normalisation permet d'avoir au départ de l'expérience une intensité normalisée de 1 à la membrane. L'intensité normalisée peut être représentée en fonction de deux temps : soit le temps d'exposition cumulé (le temps pendant lequel le fluorophore a été éclairé), soit le temps qui s'écoule après avoir effectué la dilution. Ces deux temps sont reliés par le temps d'exposition de chaque image et la fréquence à laquelle j'acquière les images. Par exemple si j'acquière une image toute les 10 s avec un temps d'exposition de 100 ms, le temps d'exposition cumulé à la fin de l'expérience (60 minutes) sera de 36 s, alors que le temps après dilution sera de 60 minutes. Chaque expérience possède son propre temps d'exposition (dépend de la protéine fluorescente), alors que toutes les expériences sont effectuées avec des temps après dilution comparables. Néanmoins, pour un temps après dilution comparable, il est possible d'avoir des temps d'expositions différents. Lorsque je compare des intensités de fluorescences entre des GUV et des billes, le temps d'exposition parait un choix plus logique, en effet pour quantifier le bleaching, le temps important est le temps d'exposition. De plus comme nous le voyons par la suite, il n'y a pas de désorption de l'ezrine sur la membrane des GUV. Donc il est possible de comparer directement GUV et billes *via* le temps d'exposition.

La normalisation de l'intensité de fluorescence est appliquée aux billes fluorescentes (figure III.B.27), qui présentent une décroissance de fluorescence due au photoblanchiment. L'intensité de fluorescence normalisée est tracée en fonction du temps d'exposition des billes. L'intensité de fluorescence diminue avec le temps d'exposition indiquant un photoblanchiment du fluorophore. Il est possible d'ajuster une courbe en exponentielle sur l'évolution de l'intensité. La fonction d'ajustement donne un temps caractéristique de décroissance de 126 s.

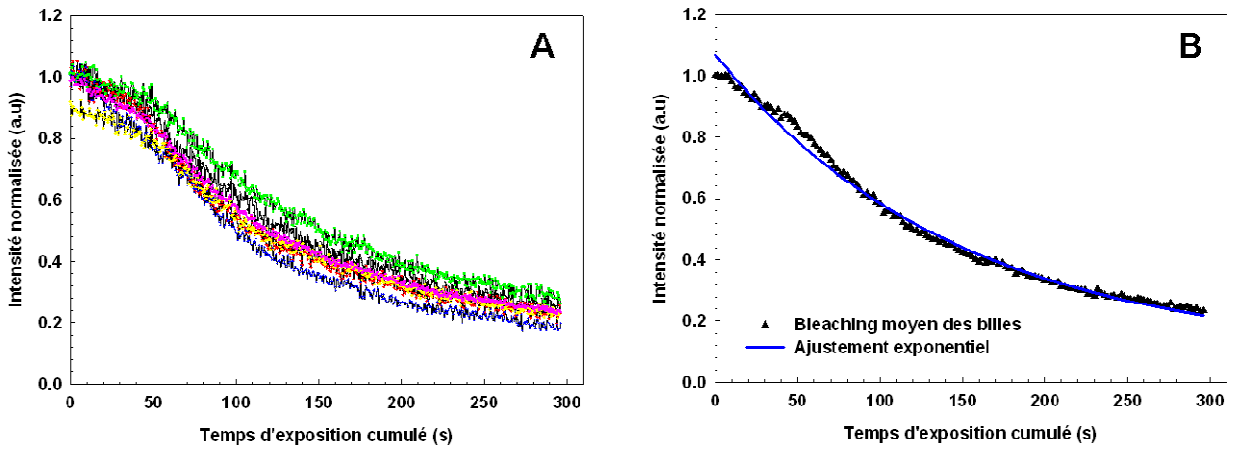



Fig III.B.27. (A) Décroissance de la fluorescence de 6 billes en fonctions du temps d'exposition. (B) Décroissance moyenne calculée sur 6 billes en fonction du temps d'exposition. La courbe représente l'ajustement de la décroissance de fluorescence à l'aide d'une fonction mono-exponentielle.

Nous effectuons une analyse similaire sur des GUV dans la figure III.B.28. L'intensité normalisée est tracée en fonction du temps après dilution. Une décroissance d'intensité est observée, après 2000 secondes l'intensité passe de 1 à 0.6 / 0.8. Mais cette décroissance est-elle due à la désorption de la protéine ou à du photoblanchiment ?

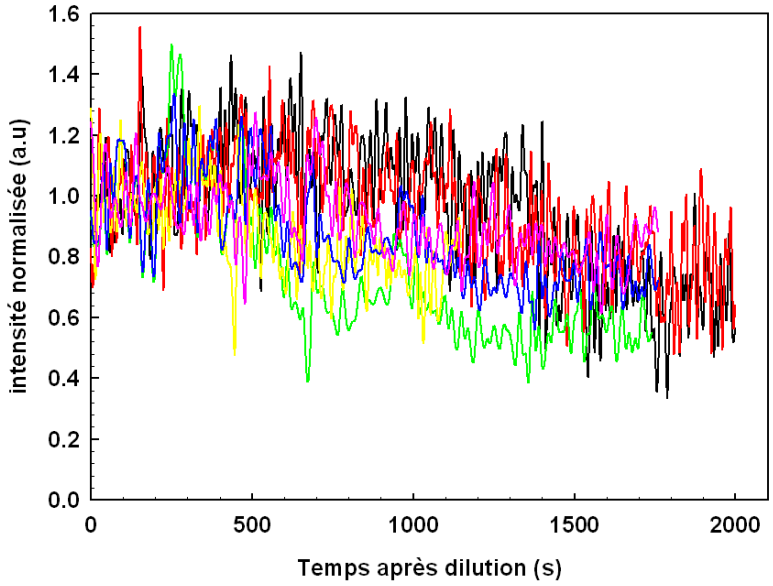



Fig III.B.28. Décroissance de l'intensité normalisée de 6 GUV en fonction du temps après la dilution.

Nous comparons l'évolution d'intensité d'une GUV à l'évolution d'intensité moyenne des billes sur la figure III.B.29. L'intensité de fluorescence de la GUV évolue comme l'intensité de fluorescence des billes.

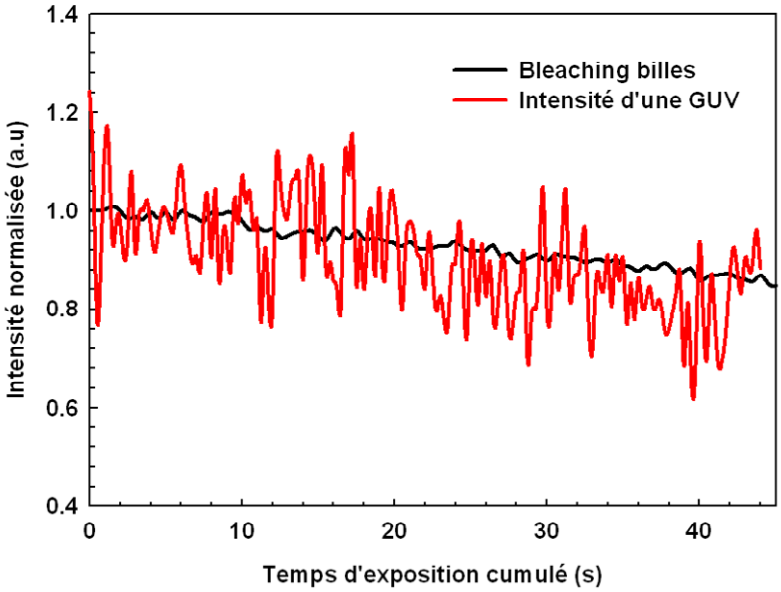



Fig III.B.29. Evolution du profil d'intensité d'une GUV diluée dans le tampon de l'ezrine neutralisé et d'une bille sur laquelle est déposée de l'ezrine fluorescente en fonction du temps d'exposition.

L'expérience a été réitérée sur 5 autres vésicules qui suivent toutes la même décroissance d'intensité que les billes. Nous pouvons conclure que l'ezrine présente sur la GUV ne se désorbe pas et que la baisse d'intensité de fluorescence n'est due qu'au photoblanchiment. L'interaction entre ezrine et GUV semble donc irréversible.

Afin de voir si cet effet n'est pas un artefact lié à la présence du fluorophore sur l'ezrine, une autre expérience a été faite. Les GUV ont été pré-incubées durant 15 minutes avec l'ezrine WT avant de les mettre en contact avec l'ezrine fluorescente. Le pourcentage de marquage est de 1%, en comparaison des 25% obtenus quand l'ezrine fluorescente est mise en premier au contact des GUV. Cette dernière expérience montre que les GUV ayant déjà interagi avec l'ezrine WT ne peuvent plus interagir avec l'ezrine fluorescente (ezrine-Alexa488 ou ezrine-Alexa546). L'irréversibilité est donc présente même quand l'ezrine n'est pas couplée à un fluorophore.

Nos résultats se rapprochent de ceux du groupe de Steinem (**Herrig et al. 2006; Janke et al. 2008**). Ces auteurs ont montré qu'il est possible de rincer des bicouches supportées contenant du PIP2 sur lesquelles est adsorbée l'ezrine sans observer de désorption de la protéine. Si la liaison l'ezrine et le PIP2 est coopérative sur les membranes planes, cela peut expliquer pourquoi l'interaction semble irréversible. Cette interaction coopérative pourrait être due à

des interactions entre les protéines sur la surface, ce qui expliquerait également la formation d'amas d'ezrine et la réorganisation du PIP2 sous-jacent. La non-désorption de l'ezrine sur la membrane des GUV ou sur les bicouches supportées est en contradiction avec une interaction 1 : 1 entre l'ezrine et le PIP2. Alors la notion de constante de dissociation $K_d$ n'est plus exacte, et l'affinité dépend aussi de la quantité d'ezrine liée au PIP2 c'est-à-dire que la liaison de l'ezrine au PIP2 est coopérative.

**La formation d'agrégats d'ezrine sur les GUV et la non-désorption de celle-ci sont en accord avec la formation de clusters d'ezrine sur les membranes ainsi que la présence d'une interaction ezrine / membrane résistante au lavage. Néanmoins, l'irréversibilité de l'interaction ezrine / PIP2 n'est pas compatible avec la notion d'affinité, ni avec la stœchiométrie 1 : 1.**

## III.B.4 – Conclusion

Le système biomimétique a été caractérisé en terme d'incorporation du lipide par mesure du potentiel zêta, et en terme de répartition du lipide dans la membrane par quantification des hétérogénéités de fluorescence de la membrane. Les GUV ont été mises en contact avec l'ezrine, ce qui a permis de mettre en évidence une réorganisation de la répartition du PIP2 sous l'effet de l'interaction avec la protéine et une interaction irréversible de la protéine avec les vésicules.

L'étape suivante dans la construction d'un système mimant l'attachement du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique *via* l'ezrine et le PIP2, est de comprendre comment l'ezrine interagit avec l'actine. En effet cela permettra de poser des conditions expérimentales optimales pour la reconstruction du système. Le chapitre suivant s'intéressera aux interactions entre actine et ezrine et aux possibles effets de l'ezrine sur la dynamique de polymérisation de l'actine.

# III.C – Interactions entre ezrine, actine et PIP2

L'ezrine est importante pour la formation de bordure en brosse ainsi que pour le remodelage du cytosquelette (voir chapitre I). Elle est aussi la première protéine arrivant à la membrane lors du phénomène de formation de bourgeonnements cellulaire (« blebs ») (**Charras et al. 2006**) et est également importante pour la construction du cortex d'actine sur les phagosomes (**Defacque et al. 2000**). De plus, il a été décrit que l'ezrine possède deux sites d'interaction avec le monomère d'actine (**Roy et al. 1997; Turunen et al. 1994**) (*figure III.C.1*).

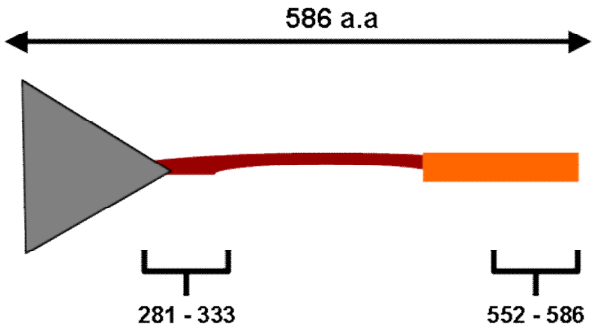



Fig III.C.1. Schéma de l'ezrine. Les deux accolades représentent les sites d'interaction connus avec l'actine.

La question suivante pourrait donc être posée : dans une configuration où l'ezrine est liée avec le PIP2, peut-elle favoriser la formation de nuclei ?
Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de l'ezrine et /ou du PIP2 sur la polymérisation de l'actine au moyen de deux techniques expérimentales : la spectroscopie de fluorescence et la microscopie à onde évanescente.

## III.C.1 – Suivi de la polymérisation de l'actine par spectrofluorimetrie

La polymérisation de l'actine peut être également suivie en spectrométrie de fluorescence en utilisant de l'actine marquée au pyrène. La fluorescence du pyrène est

augmentée lorsque le monomère s'incorpore au filament. La fluorescence est directement reliée à la quantité de filaments présents en solution, ce qui permet de suivre la cinétique de polymérisation (**Cooper et al. 1983**).

Les expériences utilisant l'actine pyrène sont réalisées à une concentration en actine de 4 µM qui contient 15 % en molaire d'actine pyrène. Le tableau III.H montre les volumes ajoutés dans les mélanges pour la polymérisation d'actine en présence d'ezrine WT et de PIP2. Dans les expériences de fluorescence du pyrène le rapport ω = [PIP2] / [Ezrine] varie de 0 à 30.

| | **Volume (µL)** |
|---|---|
| **Tampon F 4X** | 15 |
| **Solution d'ezrine WT** | 15 |
| **Solution de PIP2** | 15 |
| **Solution d'actine à 16 µM** | 15 |

Tableau III.H. Mélange typique des différentes solutions lors d'une expérience de polymérisation de l'actine suivie par spectrométrie de fluorescence.

Le tampon final est à un pH de 7.4 et il est composée de : 34 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA, 10 mM TRIS, 17 mM NaCl, 0.15 mM d'ATP, 0.4 mM DTT, 6 mM MES.

Dans un premier temps, des courbes de pyrène sont réalisées seulement en présence d'ezrine et d'actine. Puis, la quantité d'ezrine est fixée et la quantité de PIP2 ajoutée est modulée sur une gamme de 5 à 30 µM. La figure III.C.2 représente la fluorescence du pyrène suivie en fonction du temps.

Nous n'observons pas d'accélération de la polymérisation de l'actine en présence d'ezrine. Les courbes sont très proches de celles obtenues en présence d'actine seule. Elles se superposent toutes avec la courbe de polymérisation de l'actine seule. De même, en présence de PIP2, aucun effet notable n'est observé sur la polymérisation de l'actine, que ce soit en absence ou en présence d'ezrine.

Les expériences de pyrène ont présenté des problèmes de reproductibilité. Aucun effet de dose n'a été systématiquement observé, que ce soit avec l'ezrine ou avec le PIP2. Néanmoins ce qui a été obtenu fréquemment est représenté dans la figure III.C.2, ainsi que dans la figure III.C.3. Les courbes de polymérisation en présence d'ezrine avec ou sans PIP2, sont, à la fin de l'expérience, à un niveau de fluorescence plus élevé de (10.5 $\pm$ 9) % par rapport au niveau de fluorescence de l'actine seule. L'augmentation de fluorescence n'étant pas systématique et

ne dépendant pas de la quantité d'ezrine au contact de l'actine, il n'est pas impossible que cela soit purement artefactuel.

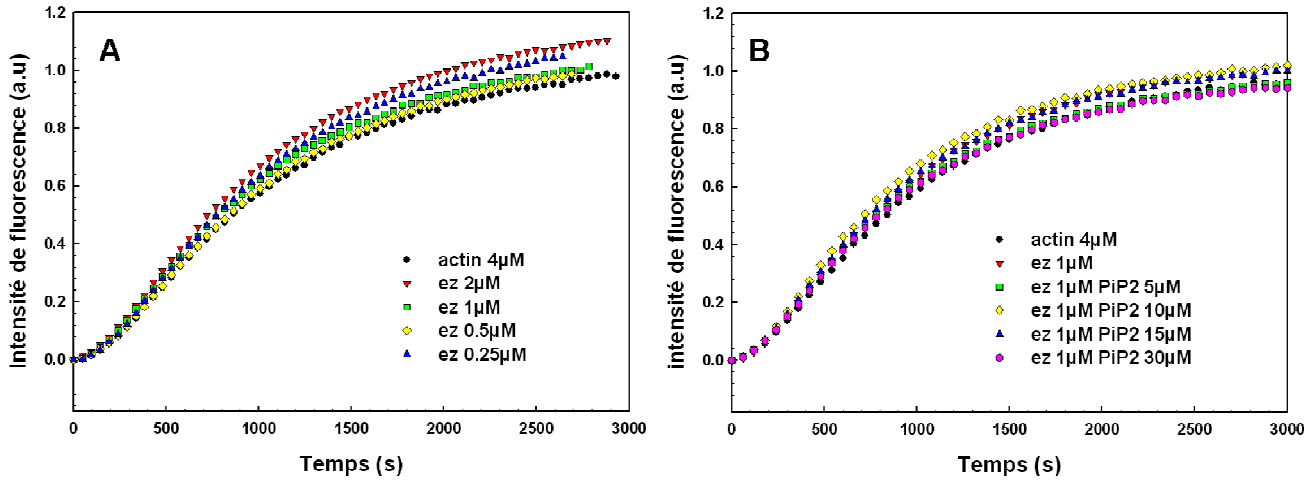



Fig III.C.2. (A) Fluorescence de l'actine pyrène en fonction du temps, correspondant à 4 µM d'actine polymérisant en présence de concentrations croissantes d'ezrine en solution. (B) Même type d'expérience pour une solution de 4 µM d'actine, 1 µM d'ezrine et des quantités croissantes de PIP2 croissantes.

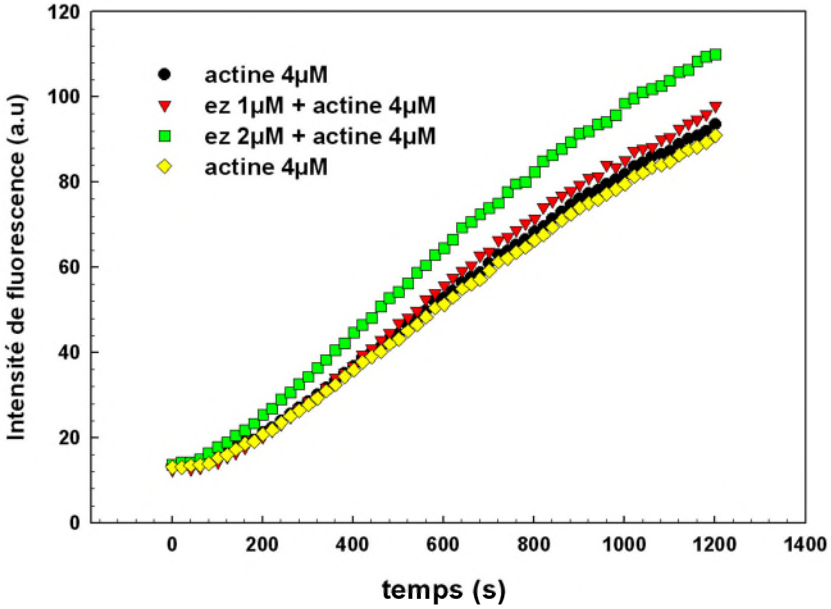



Fig III.C.3 Fluorescence de l'actine pyrène en fonction du temps montrant qu'en présence d'ezrine, le niveau d'intensité est supérieur aux fluorescences contrôles de l'actine seule.

Les expériences de pyrène nous permettent de voir l'actine qui polymérise en solution et en volume. Dans nos expériences, il n'y a pas de différences flagrantes entre les différentes conditions. C'est pourquoi, il nous a semblé nécessaire d'observer les premiers temps de polymérisation, ce que les expériences de fluorescence du pyrène ne peuvent donner.

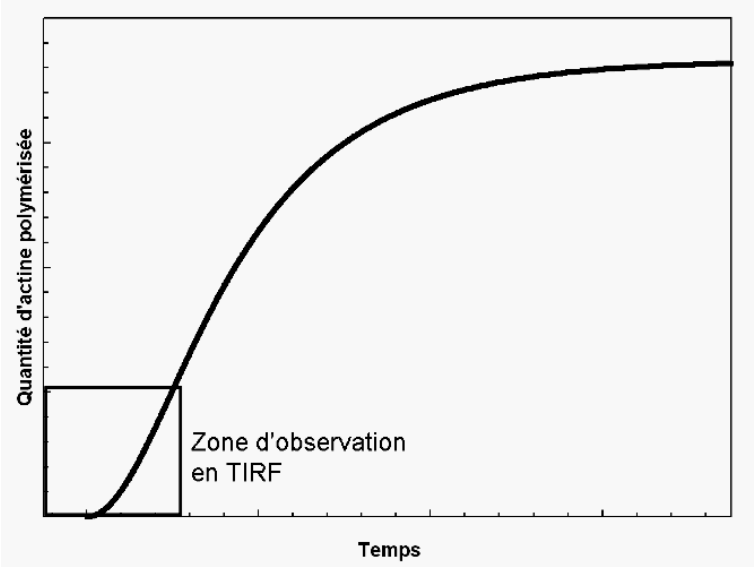



Fig III.C.4. Courbe de polymérisation de l'actine. Le pyrène donne des informations aux temps longs et le TIRF donne des informations au temps courts. Le carré représente la zone temporelle d'observation en TIRF.

Donc, dans le souci d'étudier les possibles effets que l'ezrine sur la formation de noyaux, la microscopie à ondes évanescentes (TIRF) sera utilisée. Elle nous permet de voir les premiers temps de polymérisation, lorsque la concentration en actine polymérisée est de l'ordre de quelques nano molaires de filaments (*fig III.C.4*).

## III.C.2 – Expériences de microscopie à onde évanescente (TIRF)

Nous allons étudier les interactions entre ezrine et actine à l'aide de la microscopie à onde évanescente (TIRF), qui permet d'étudier la dynamique de polymérisation de l'actine au voisinage d'une surface.

En microscopie TIRF, l'élongation des filaments d'actine dans différentes conditions a été suivie au cours du temps durant 20 minutes pour une concentration d'actine proche de 1 µM (voir chapitre II). Etant donné que la concentration critique de polymérisation est de 0.1 µM, les filaments apparaissent spontanément et commencent à croître dans nos conditions expérimentales. Afin d'étudier l'effet de l'ezrine sur la dynamique de polymérisation (nucléation et croissance des filaments), nous avons réalisé des polymérisations d'actine en présence d'ezrine et en présence ou en absence de PIP2. Les expériences ont également été réalisées en absence et en présence de profiline.

La profiline est une petite protéine de 12-15 kDa qui s'associe avec le monomère d'actine. Elle inhibe la nucléation spontanée et empêche le monomère de s'associer au bout pointu (**Pollard et al. 1984**), mais elle n'empêche pas le monomère d'actine de s'associer avec le

bout barbé du filament (**Pantaloni et al. 1993**). La constante d'affinité de la profiline pour le monomère d'actine est de l'ordre de 0.1 µM. L'ajout de profiline présente l'avantage de se rapprocher de conditions physiologiques. En effet, *in vivo*, l'actine est complexée à des protéines (comme la profiline) qui vont la séquestrer et ainsi réguler sa dynamique de polymérisation (**Pantaloni et al. 2001**). La profiline interagit également avec le PIP2 avec une affinité comparable a son affinité pour le monomère d'actine (**Chaudhary et al. 1998; Goldschmidt-Clermont et al. 1990**)

### ***III.C.2.a – Polymérisation d'actine dans différentes conditions***

Le mélange contenant les protéines et le lipide (actine, profiline, ezrine et PIP2) est réalisé dans un volume de 30 µL (voir tableau III.I). Dans les expériences de microscopie TRIF le rapport ω = [PIP2] / [Ezrine] varie de 0 à 37. Lorsque l'ezrine et le PIP2 sont présents simultanément, le pourcentage de liaison de l'ezrine est de l'ordre de 85 %.

| | **Absence de profiline** | | **Présence de profiline** | |
|---|---|---|---|---|
| | **V en µL** | **[C] finale en µM** | **V en µL** | **[C] finale en µM** |
| Ezrine WT 20 µM | **1.5** | **1** | **1.5** | **1** |
| PIP2 900 µM | **1** | **30** | **1** | **30** |
| Tampon G | **5.3** | **--** | **4.1** | **--** |
| Tampon de fluo | **18** | **--** | **18** | **--** |
| 10X KMEI | **3** | **--** | **3** | **--** |
| Profiline 90 µM | **0** | **0** | **1.2** | **3.6** |
| Actine 30 µM | **1.2** | **1.2** | **1.2** | **1.2** |

Tableau III.I. Mélange réactionnel des expériences de TIRF

Au final le mélange des différents tampons donne une solution dont la composition est : 100 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 20 mM imidazole, 10mM DTT, 0.5% methylcellulose, 0.018 mg/ml de catalase, 3 mg/ml glucose, 0.18 mg/ml de glucose oxydase, 50 µM d'ATP et 0.16% BSA. Le tampon utilisé dans les expériences de TIRF est différent du tampon utilisé dans les expériences de fluorescence du pyrène. La différence la plus importante entre les tampons est que le tampon utilisé lors des expériences de TIRF contient plus de sels, ceci a pour effet d'accélérer la polymérisation.

L'ordre d'ajout des différents constituants du mélange réactionnel est important. En effet plusieurs ordres de mélanges ont été testés et beaucoup n'ont eut aucuns effets sur les expériences en TIRF. Des différents essais, il en a été déduit que l'ezrine WT et le PIP2

doivent être mis en contact avant d'ajouter toutes les autres solutions pour que l'interaction ezrine / PIP2 se fasse dans de bonnes conditions. En effet, l'ordre d'ajout des différentes solutions est important pour éviter que le PIP2 n'interagisse avec les ions divalents, même s'il est possible que les ions soient chélater par l'EGTA et l'ATP, et la profiline avant d'interagir avec l'ezrine.

Les figures III.C.5 et III.C.6 montrent les filaments d'actine à différents temps et pour différentes conditions.

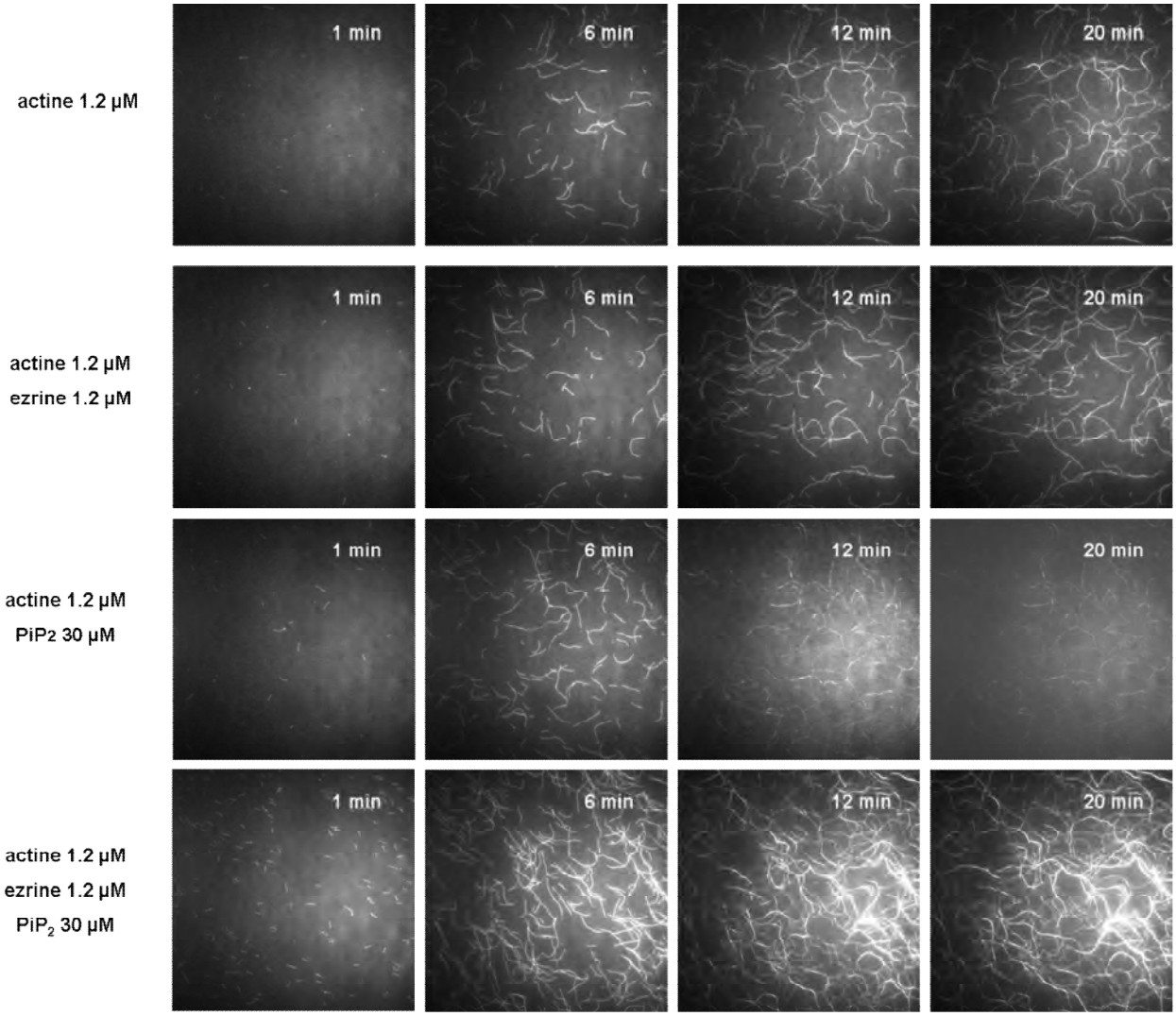



Fig III.C.5. Images en microscopie TIRF des filaments d'actine dans différentes conditions en absence de profiline. Le temps zéro correspond au temps de montage de la lamelle d'observation. Les champs d'observation sont des carrés de 50 µm x 50 µm.

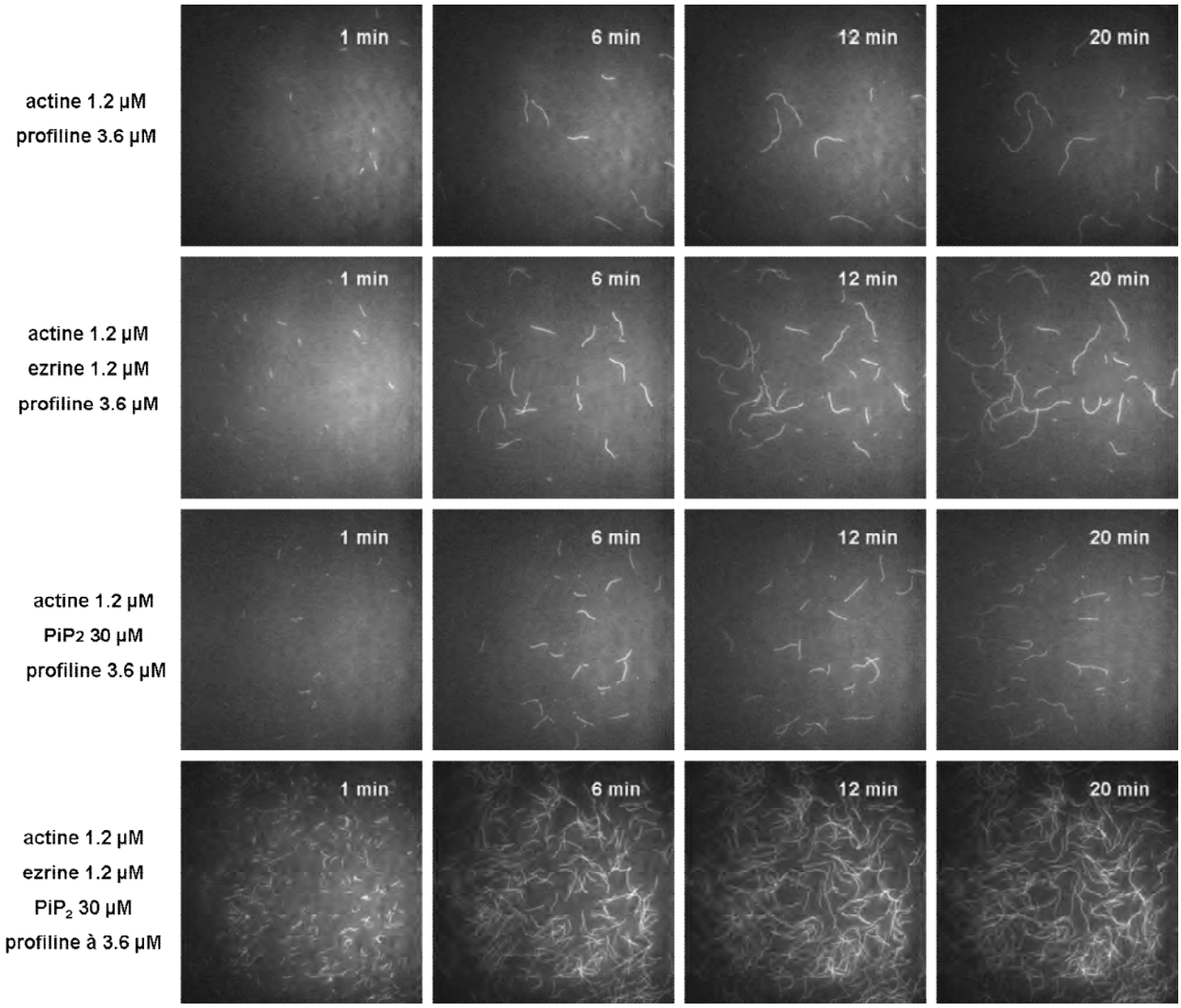



Fig III.C.6. Images en microscopie TIRF des filaments d'actine dans différentes conditions en présence de profiline. Le temps zéro correspond au temps de montage de la lamelle d'observation. Les champs d'observation sont des carrés de 50 µm x 50 µm.

Tout d'abord nous pouvons observer que les filaments croissent sur la lamelle dans toutes les conditions. Néanmoins, lorsque l'ezrine et le PIP2 sont ajoutés dans le mélange, la densité de filaments apparaît plus grande. La présence de profiline ne semble pas changer qualitativement les expériences. Le seul effet est un nombre de filaments moindre.

Dans le but de comparer quantitativement ces images, celles-ci ont été binarisées et la valeur moyenne d'intensité de champs d'observation est calculée (voir chapitre II). Cette intensité représente la densité de filaments dans le champ d'observation. L'intensité moyenne d'un champ d'observation est représentée en figure III.C.7 en fonction du temps.

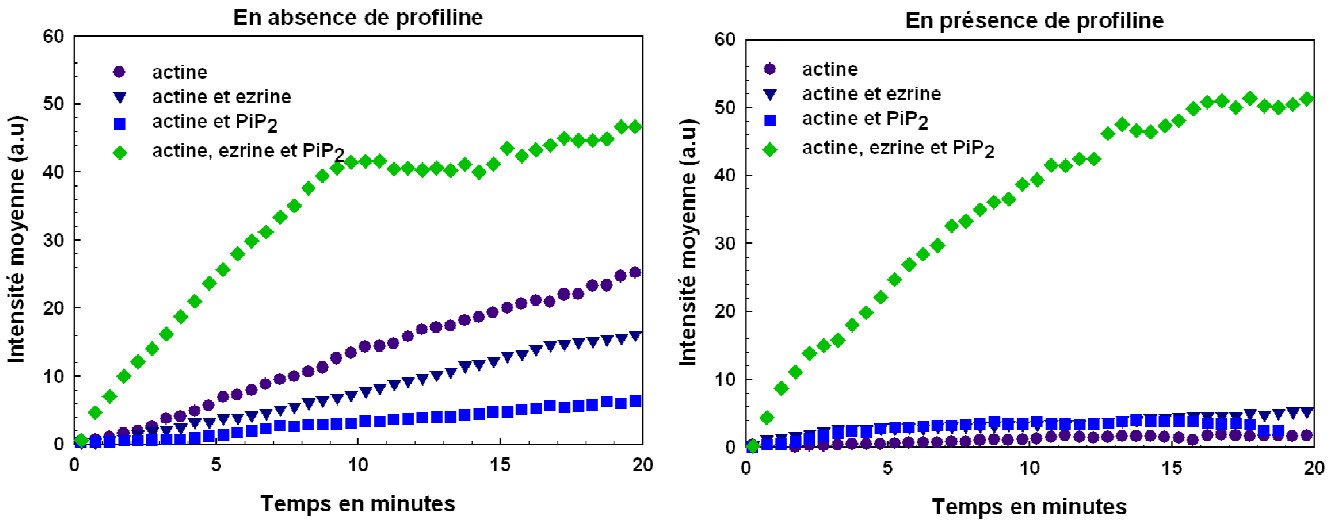



Fig III.C.7. Intensité moyenne d'un champ d'observation en fonction du temps d'observation. La densité de filaments est significativement plus élevée en présence d'ezrine et de PIP2. Deux expériences ont été réalisées pour chaque condition.

D'autres champs d'observation ont également été observés au cours du temps, et tous les résultats sont très similaires avec des niveaux d'intensité comparables. L'intensité moyenne du champ d'observation est maximale lorsque l'actine polymérise en présence d'ezrine et de PIP2 que ce soit en absence ou en présence de profiline. Sans profiline, l'ajout d'ezrine seule ou de PIP2 seul, a un léger effet sur le niveau d'intensité. En présence de profiline les différences entre les conditions, actine seule, présence d'ezrine, présence de PIP2, sont fortement augmentées : le niveau d'intensité du champ d'observation reste proche de zéro dans tous les cas, sauf en présence d'ezrine et de PIP2 où l'intensité est très élevée. A t = 10 minutes, en l'absence de profiline, l'intensité moyenne de la zone d'observation en présence de PIP2 et d'ezrine simultanément, est au minimum quatre fois plus élevée que les autres conditions. En présence de profiline, cette même intensité moyenne à t = 10 minutes est au minimum dix fois supérieure aux autres conditions. La présence de la profiline augmente l'écart d'intensité moyenne de fluorescence qui existe entre l'actine en présence de PIP2 et d'ezrine simultanément par rapport aux autres conditions.

La densité de filaments dans le champ d'observation est donc reliée à la présence combinée de l'ezrine et de PIP2.

Au vu de ces résultats, nous avons émis deux hypothèses pour expliquer pourquoi il y a plus d'actine polymérisée dans le champ d'observation :

- Les filaments auraient la même taille mais seraient plus nombreux dans la zone de l'onde évanescente.

- Les filaments seraient plus longs car les monomères s'associeraient plus rapidement.
- Une combinaison des deux.

La taille moyenne des filaments obtenus dans les différentes conditions et mesurée au bout de 20 minutes de polymérisation est représentée sur la figure III.C.8. Un minimum de 30 filaments a été analysé dans chaque condition (voir chapitre II). Les longueurs des filaments sont similaires dans toutes les conditions : elles ont toutes une valeur moyenne d'environ 20 µm.

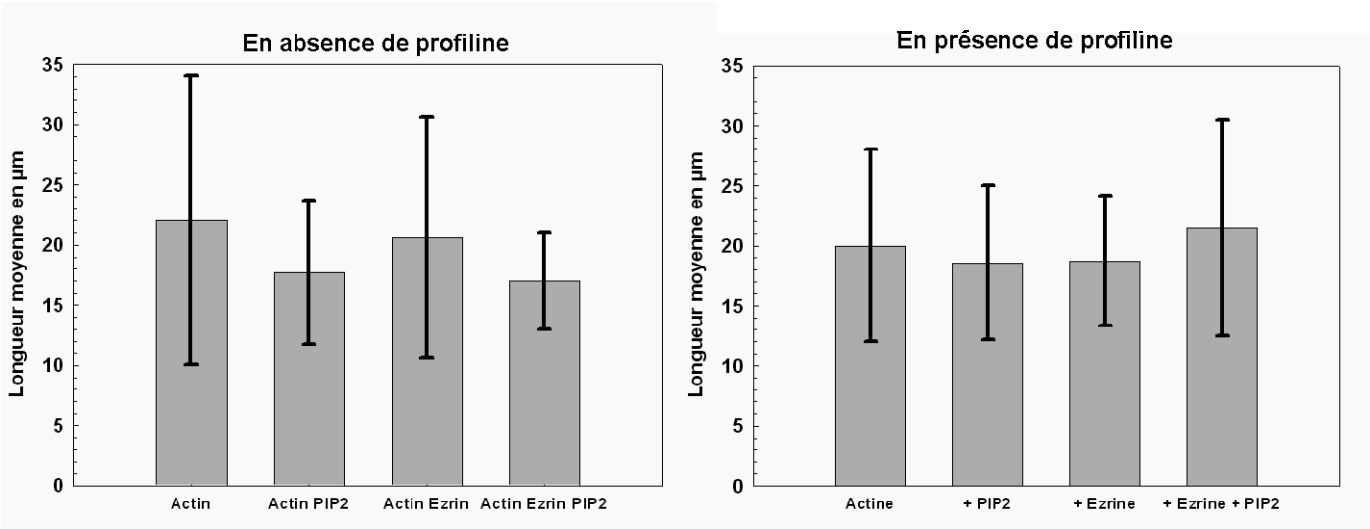



Fig III.C.8. Longueur moyenne des filaments après 20 minutes de polymérisation dans les différentes conditions. La barre d'erreur représente la déviation standard.

Les vitesses d'élongation des filaments ont également été mesurées et les constantes d'associations $k_+$ déduits (voir chapitre II). Ils sont représentés sur la figure III.C.8. Sans profiline, le $k_+$ de l'actine seule est de (9.7 $\pm$ 1) $\mu M^{-1}.s^{-1}$, en présence d'ezrine seule le $k_+$ est de (9.1 $\pm$ 1) $\mu M^{-1}.s^{-1}$, en présence de PIP2 seul le $k_+$ est de (10.2 $\pm$ 0.7) $\mu M^{-1}.s^{-1}$.

En présence de profiline, il n'y a pas de différences majeures : le $k_+$ de l'actine seule est de (9.4 $\pm$ 1) $\mu M^{-1}.s^{-1}$, en présence d'ezrine seule le $k_+$ est de (8.7 $\pm$ 2) $\mu M^{-1}.s^{-1}$, en présence de PIP2 seul le $k_+$ est de (7.4 $\pm$ 0.5) $\mu M^{-1}.s^{-1}$.

Lorsqu'il y a la présence simultanée d'ezrine et de PIP2, les $k_+$, avec et sans profiline sont de (10.5 $\pm$ 2.7) $\mu M^{-1}.s^{-1}$ et (9.7 $\pm$ 0.5) $\mu M^{-1}.s^{-1}$.

*In vitro*, dans des conditions de polymérisation similaires aux nôtres, le $k_+$ de l'actine polymérisant seule se situe entre 8 $\mu M^{-1}.s^{-1}$ et 12 $\mu M^{-1}.s^{-1}$ (**Pollard 1986**).

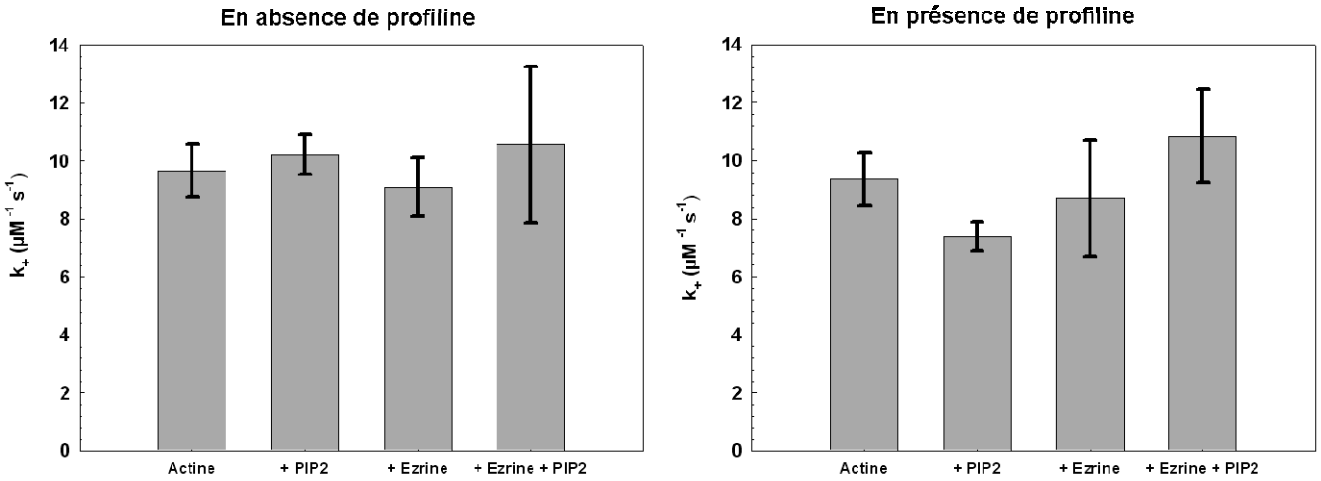



Fig III.C.9. $k_+$ des filaments dans les différentes conditions de polymérisation. La barre d'erreur représente la déviation standard.

Les constantes d'association $k_+$ sont également les mêmes dans toutes les conditions de polymérisation.

En présence d'ezrine et de PIP2, la vitesse d'ajout des monomères sur le filament est la même que dans le cas contrôle. De plus les expériences de pyrène montrent que les filaments semblent commencer à croitre en même temps (pas de temps de nucléation différent). C'est pourquoi les tailles moyennes des filaments ne montrent pas de différences significatives.

Au regard des tailles moyennes, des constantes d'association et des expériences de pyrène, il n'y pas d'effet de l'ezrine sur la dynamique de polymérisation du filament.

Néanmoins, au regard de l'intensité moyenne du champ d'observation, une densité de filament plus forte est observée seulement en présence d'ezrine et de PIP2. La présence de profiline ne semble pas avoir d'incidence sur la densité de filaments lorsqu'il y a simultanément la présence d'ezrine et de PIP2.

Dans la suite des expériences de TIRF, nous avons donc choisi de travailler toujours en présence de profiline dans le mélange protéique. En effet, en se basant sur les intensités moyennes des zones d'observation, la présence de profiline augmente les différences d'intensité entre l'actine en présence d'ezrine et de PIP2 simultanément et les autres conditions.

### ***III.C.2.b – Polymérisation en présence de profiline et d'ezrine fluorescente***

Afin d'obtenir des informations complémentaires, des expériences de microscopie TIRF ont été réalisées en présence de profiline et en présence d'un mélange d'ezrine sauvage et fluorescente. L'actine marquée à la rhodamine a également été utilisée. Le but est de voir la localisation spatiale de l'ezrine et de l'actine.

Le tampon final dans lequel sont faites les expériences est le même que dans les chapitre III.C.2.a et b. La polymérisation de l'actine se fait à 0.8 µM en présence de 1 µM d'ezrine fluorescente (0.8 µM d'ezrine WT + 0.2 µM d'ezrine-Alexa488).

La figure III.C.10 montre le résultat d'une telle expérience de polymérisation.

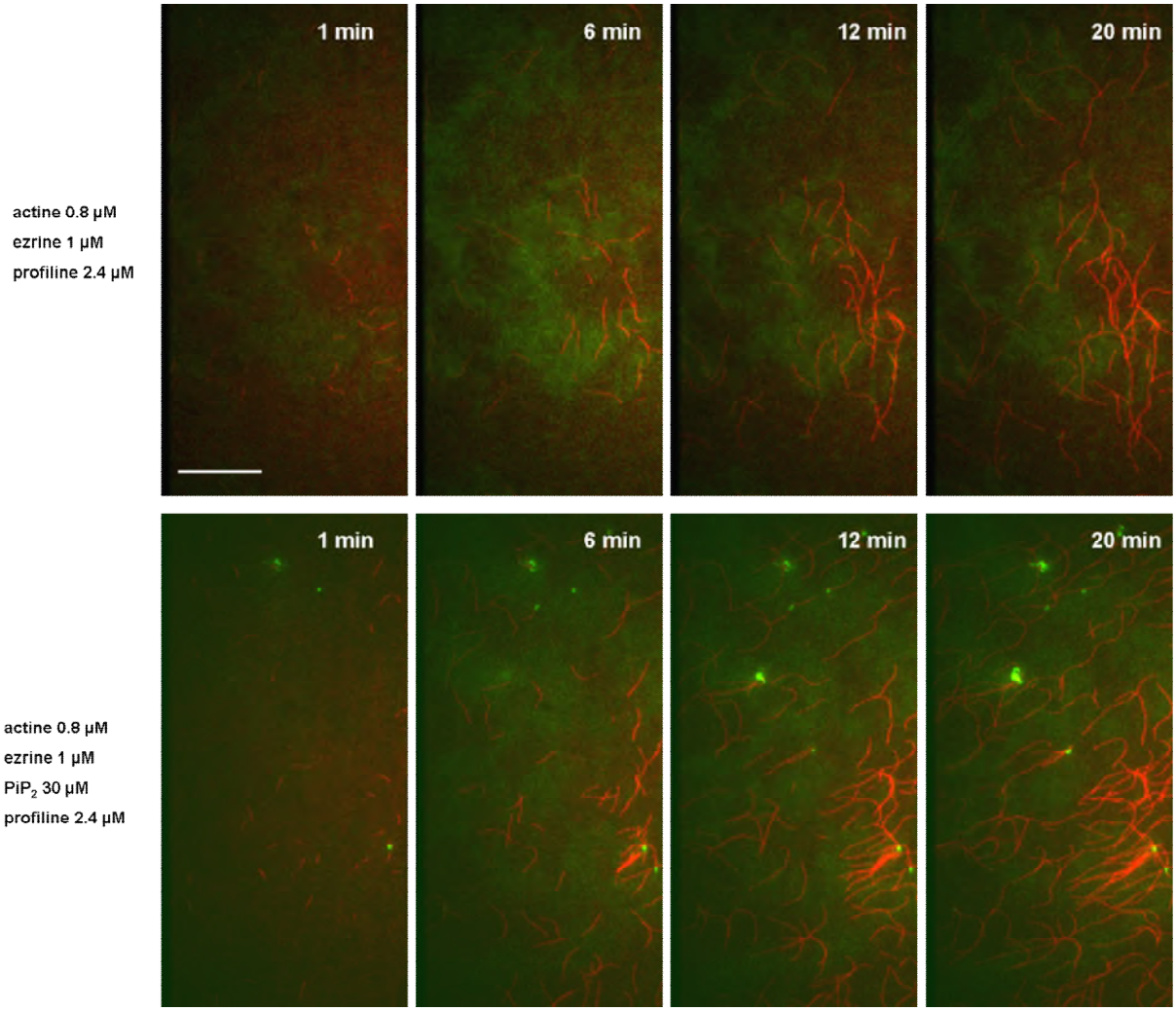



Fig III.C.10. Images en microscopie TIRF de filaments d'actine en rouge et d'ezrine fluorescente en vert, en absence et présence de PIP2. Le temps zéro correspond au temps de montage de la lamelle d'observation. La barre représente 15 µm.

L'intensité moyenne de la zone d'observation est au moins deux fois plus élevée lors de la présence combinée d'ezrine et de PIP2 que dans les autres conditions. La densité de filaments est plus grande seulement en présence d'ezrine et de PIP2. Ceci confirme les observations faites sans ezrine fluorescente. Nous observons également la présence d'agrégats d'ezrine uniquement en présence de PIP2 (*figure III.C.11*).

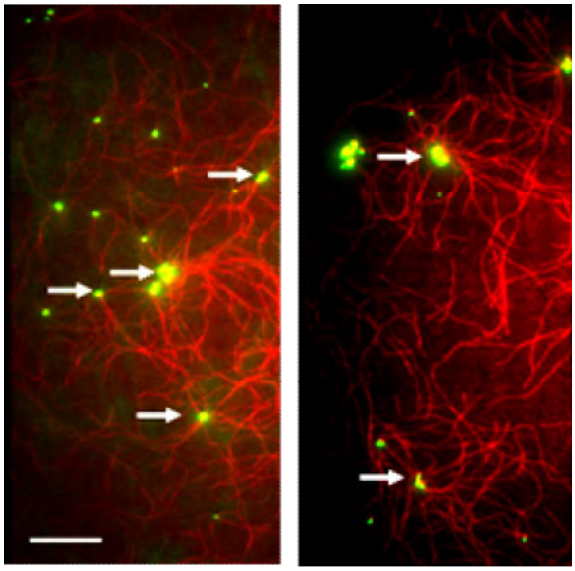


Fig III.C.11. Images en microscopie TIRF après 20 minutes de polymérisation montrant des filaments d'actine en rouge et l'ezrine fluorescente en vert en présence de PIP2. Nous pouvons observer la présence d'agrégats fluorescents, indiqués par des flèches. La barre représente 10 µm.

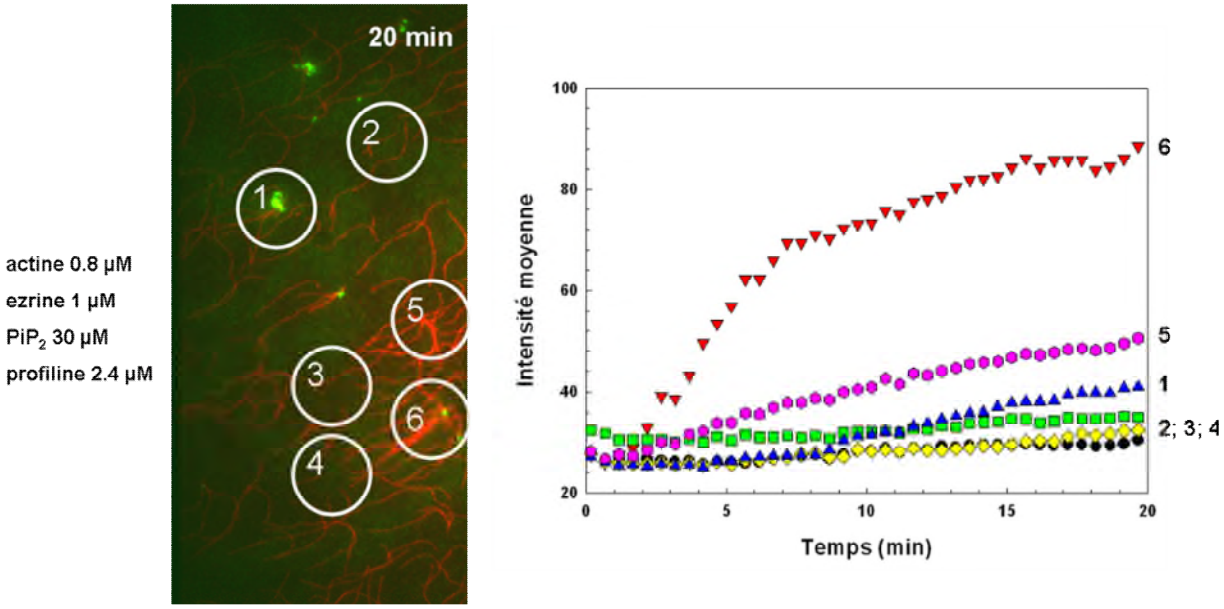



Fig III.C.12. Evolution au cours du temps de l'intensité moyenne de la fluorescence de l'actine en contact avec de l'ezrine et du PIP2, de différentes zones dans le champ d'observation. Les numéros représentent les différentes zones d'observations. Les intensités les plus élevées sont détectées autour des agrégats d'ezrine.

Une analyse d'intensité moyenne de différentes zones circulaires est faite (une vingtaine de zones par champ d'observation). Sur la figure III.C.12 (A), seulement six zones sont représentées. La figure III.C.12 (B) représente l'évolution temporelle de l'intensité de fluorescence moyenne des différentes zones observées. Il apparaît que l'intensité moyenne due à la fluorescence de l'actine est, au bout de 20 minutes de polymérisation, plus importante autour des agrégats que dans une zone ou il n'y en a pas. L'intensité moyenne de fluorescence est supérieur d'au moins (25 $\pm$ 27) % autour des agrégats (statistique faite sur 2 expériences et 8 champs d'observation). La forte dispersion de la valeur de l'intensité moyenne vient du fait que cette valeur d'intensité à l'air de dépendre de la taille des agrégats de protéines.

### ***III.C.2.c – Polymérisation de l'actine en présence de billes sur lesquelles est adsorbée de l'ezrine fluorescente.***

Dans le but d'obtenir des informations additionnelles pour la compréhension des phénomènes observés lors de la polymérisation d'actine en présence d'ezrine et de PIP2, des expériences complémentaires utilisant de l'ezrine adsorbée sur une surface sont effectuées.

Les expériences de polymérisation de l'actine ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe III.C.2.a, c'est-à-dire en présence de 0.8 µM d'actine et de profiline. Nous avons donc utilisé des billes de polystyrène sur lesquelles de l'ezrine a été déposée (les billes ont été préalablement incubées avec de l'ezrine). Un mélange d'ezrine sauvage et d'ezrine fluorescente (0.8 µM d'ezrine WT + 0.2 µM d'ezrine-Alexa488), a été incubé avec des billes en polystyrène de 2 µm de diamètre possédant des groupements carboxyles à la surface. L'ezrine fluorescente adsorbée sur la bille permet leur visualisation. La figure III.C.13 montre la polymérisation de l'actine au contact des billes avec et sans PIP2 en solution.

Dans des travaux précédents, C. Roy avait montré que l'ezrine adsorbée au fond de plaques 96 puits en polystyrène se lie aux filaments d'actine (**Roy et al. 1997**). Ceci pourrait être attribué à une fragilisation des interactions intramoléculaires suivi d'une une ouverture de la molécule favorisée par la liaison au polystyrène. L'utilisation de billes sur lesquelles est adsorbée l'ezrine prouve que l'ezrine adsorbée sur une surface est capable, en présence de PIP2, de lier les filaments d'actine. Cette liaison a déjà été observée lorsque l'ezrine est adsorbée sur une surface de polystyrène. Les auteurs ont pu montrer que l'ezrine adsorbée dans des plaques, ayant un fond en polystyrène, est capable de lier les filaments d'actine. Les

auteurs montrent que le changement de conformation de l'ezrine est une conséquence de l'interaction entre l'ezrine et la surface, mais que cela n'entame en rien la spécificité des interactions entre ezrine et actine, et donc que nous sommes dans une situation physiologique où l'ezrine serait ouverte (via la liaison au PIP2 par exemple).

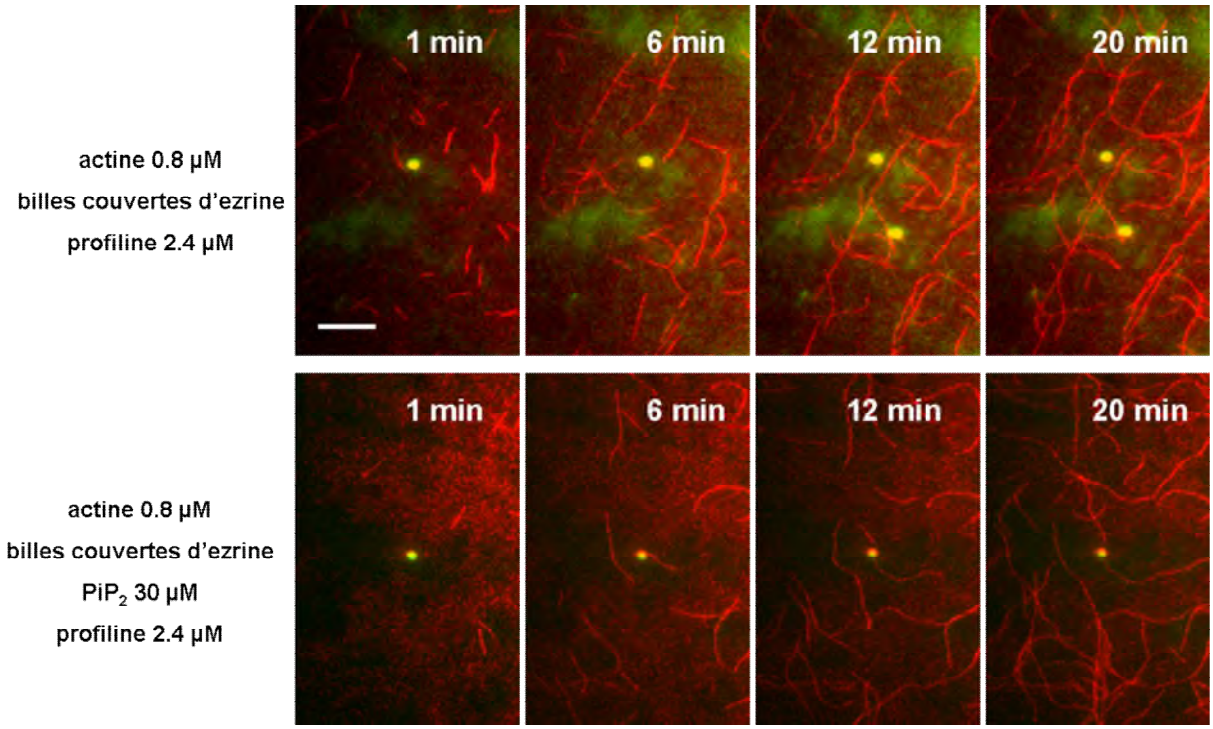



Fig III.C.13. Images en microscopie TIRF des filaments d'actine en présence de billes sur lesquelles de l'ezrine fluorescente est adsorbée, (A) en absence et (B) en présence de PIP2. L'actine est marquée en rouge et l'ezrine est marquée en vert. Le temps zéro correspond au temps de montage de la lamelle d'observation. La barre représente 5 µm.

En absence de PIP2 il n'y a pas d'interactions visibles entre les billes et les filaments. Les vitesses d'élongation et les constantes d'association sont inchangées. Elles sont égales à celles mesurées au paragraphe III.C.1.b, c'est-à-dire $k_+ = (9.3 \pm 1)\ \mu M^{-1}.s^{-1}$ en absence de PIP2, et $k_+ = (10.8 \pm 1.6)\ \mu M^{-1}.s^{-1}$ en présence de PIP2 (mesures faites sur 29 filaments pour deux échantillons).

En présence de 30 µM de PIP2 en solution, quelques billes montrent des filaments qui croissent à partir de leur surface comme indiqué sur la figure III.C.14.

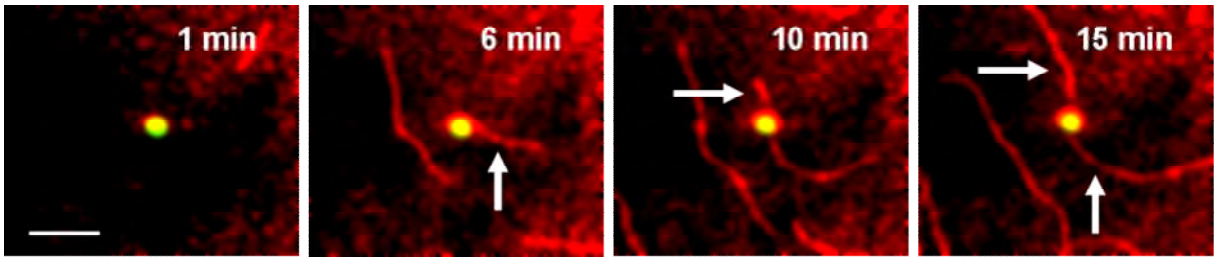



Fig III.C.14. Zoom de la figure III.C.13. Des filaments d'actine qui croissent à partir d'une bille sur laquelle de l'ezrine est adsorbée sont indiqués par des flèches. La barre représente 5 µm.

Les intensités moyennes de la fluorescence de l'actine sont mesurées autour des billes. Dans ce cas précis nous ne voyons aucunes différences notables par rapport à la polymérisation d'actine seule. En effet peu de filaments se fixent aux billes et donc ils ne permettent pas d'augmenter suffisamment l'intensité moyenne autour des billes pour que l'accroissement soit significatif.

Les filaments qui croissent à partir des billes montrent des constantes d'associations $k_+$ comparables au $k_+$ de l'actine qui polymérise en l'absence de billes, c'est-à-dire $k_+ = (11 \pm 0.8)\ \mu M^{-1}.s^{-1}$(mesure faites sur 19 filaments). La longueur moyenne est également comparable aux longueurs moyennes des filaments d'actine en absence d'ezrine et en absence de PIP2.

Le bout barbé du filament croit beaucoup plus vite que le bout pointu (**Pollard 1986**). Afin de localiser le bout barbé dans nos expériences, une expérience de photoblanchiment a été réalisée (Figure III.C.15). Une zone est photoblanchie sur l'un des filaments qui croît de la bille puis des images sont acquises après 2 et 5 min. Nous pouvons constater que la position de la zone photoblanchie n'évolue pas avec le temps et que le filament continue de croître. Cela implique que le bout qui croit (bout barbé) n'est pas en contact avec la surface de la bille.

Nous concluons de cette observation que l'ezrine n'influence pas l'ajout de monomères sur le filament tel que le feraient par exemple les formines (**Berro et al. 2007**) .

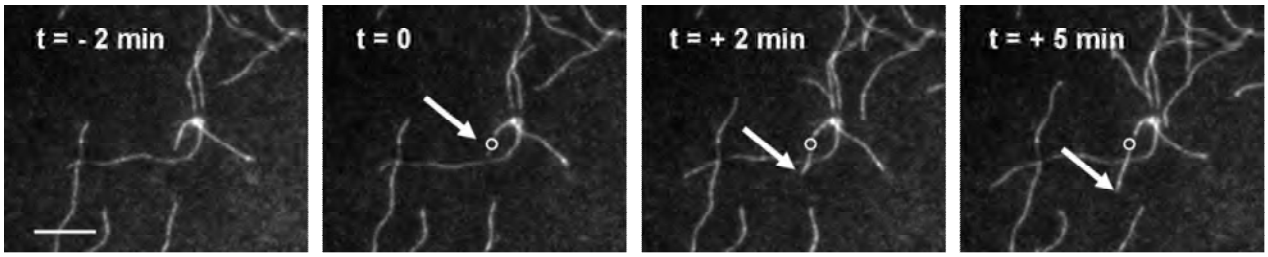



Fig III.C.15. Expérience de photoblanchiment d'un filament d'actine qui « pousse » d'une bille sur laquelle est déposée de l'ezrine. Le temps indique le moment du photoblanchiment comme t = 0. La flèche indique le bout du filament. Le cercle blanc est l'endroit photoblanchi. La barre représente 5 µm.

## III.C.3 – Discussion

Les expériences en pyrène et en TIRF ne montrent pas de changement de cinétique : il n'y aucune différence sur la dynamique de polymérisation entre l'actine seule et l'actine en présence de PIP2 ou d'ezrine ou d'une combinaison d'ezrine et de PIP2.
Les expériences de microscopie TIRF montrent un effet de l'ezrine et du PIP2 sur l'actine. En effet la densité de filaments apparaît plus grande seulement en présence d'ezrine et de PIP2. L'utilisation d'ezrine fluorescente a permis de révéler l'apparition d'agrégats de proteines sur lesquels les filaments semblent se fixer. Les expériences sur les billes confirment qu'il y a une interaction entre l'ezrine et l'actine : filaments d'actine se fixent dur les billes seulement en présence d'ezrine et de PIP2. Néanmoins, pourquoi la densité de filaments est-elle plus importante en présence d'ezrine et de PIP2 ?

Les études s'intéressant aux interactions entre ezrine, PIP2 et actine sont relativement rares. En effet, beaucoup d'études se font *in cellulo* ou bien utilisent des protéines extraites et donc possiblement phosphorylées (déjà ouvertes et actives). Néanmoins, une étude récente s'est intéressée aux interactions entre ezrine recombinante, PIP2 et actine en utilisant un système *in vitro*. Janke et collaborateurs (**Janke et al. 2008**) ont utilisé une pointe AFM sur laquelle des filaments d'actine sont adsorbés afin d'étudier le mécanisme d'ouverture d'ezrine interagissant avec du PIP2 dans une bicouche supportée. Un schéma de l'expérience est montré figure III.C.16.

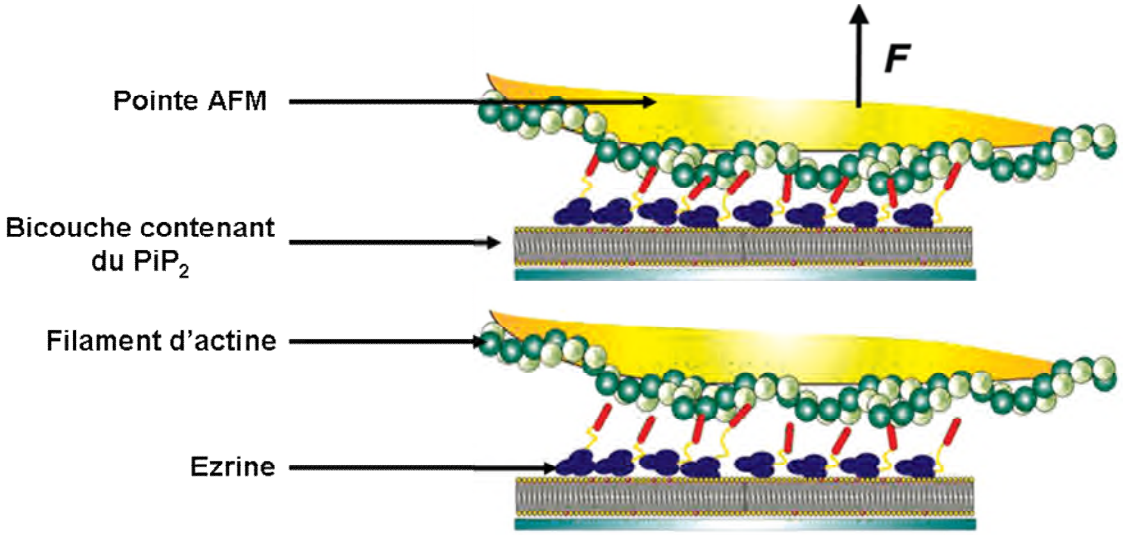



Fig III.C.16. Schéma illustrant l'expérience de Janke et collaborateurs. Une pointe AFM sur laquelle est déposée de l'actine filamenteuse vient interagir avec de l'ezrine liée à du PIP2. Adapté de (**Janke et al. 2008**).

Janke et collaborateurs déduisent, des mesures de forces, que l'ezrine est bien dans une configuration ouverte (capable de liée les filaments d'actine), et que l'ouverture due à l'interaction avec le PIP2 n'est pas une ouverture complète de la protéine (elle n'est pas entièrement dépliée). Néanmoins leurs observations concordent avec nos expériences utilisant des billes et de l'ezrine fluorescente : l'ezrine interagit bien avec les filaments d'actine en les fixant sur la pointe AFM (sur les billes ou les agrégats d'ezrine dans notre cas).

Dans nos expériences, l'augmentation d'intensité de fluorescence observée en microscopie TIRF pourrait être expliquée par un phénomène similaire. En effet, pour expliquer l'augmentation de la densité de filaments dans le champ évanescent est que l'ezrine s'adsorbe sur le verre. De la BSA est ajoutée dans la solution, mais elle ne suffit pas à empêcher l'adsorption non spécifique de l'ezrine sur le verre. La BSA est présente dans notre milieu réactionnel pour empêcher que les filaments n'interagissent trop avec la lamelle de verre : s'ils se collent sur la lamelle ils ne croissent plus. En revanche, si trop de BSA est présente dans le milieu, les filaments, qui bougent à cause des fluctuations thermiques sortent du champ évanescent : il devient impossible de les suivre pendant 20 minutes. Une forte adsorption de l'ezrine sur le verre en présence de vésicules contenant du PIP2 a déjà été observée en Spectroscopie de fluorescence corrélée (FCS) (**Blin et al. 2008**) ainsi qu'en microscopie confocale. Pour éviter cette adsorption de la protéine, il avait été nécessaire de traiter les lamelles de verre en greffant du polyéthylène glycol (PEG) sur la surface ou bien en déposant de la BSA sur la lamelle. Ce que nous observons en TIRF en présence de PIP2 et d'ezrine pourrait donc être des filaments d'actine qui interagissent avec l'ezrine sur la surface. Il y aurait plus de filaments d'actine au voisinage de la surface et donc une densité de filaments plus grandes.

Dans nos expériences nous ne voyons pas les filaments d'actine interagir avec des billes de polystyrène sans la présence du PIP2. Contrairement à Roy et collaborateurs (**Roy et al. 1997**) qui voit l'actine interagir avec de l'ezrine adsorbée sans la présence du PIP2.

Néanmoins les filaments d'actine ne sont jamais complètement marqués en fluorescence par l'ezrine présente en solution (en présence de PIP2). Il est probable que l'interaction avec le PIP2 et la surface favorise les interactions entre les filaments et la protéine comme cela a déjà été reporté mais sans PIP2 (**Roy et al. 1997**). Ce qui expliquerai pourquoi nous voyons une interaction lorsque l'ezrine et sur une surface et en présence de PIP2 (expériences avec les billes et augmentation de l'intensité de fluorescence dans les expériences de TIRF).

Les interactions entre ezrine et actine ne sont pas complètement comprises. Plusieurs articles montrent en effet des résultats conflictuels, probablement à cause de la provenance des protéines (ezrine extraites ou recombinantes et différentes isoformes d'actine). Une constante d'affinité entre l'ezrine et l'actine a déjà été mesurée par Roy et collaborateurs (**Roy et al. 1997**). Ils ont montré qu'il existe une constante de dissociation $K_d$ de l'ordre de 500 nM entre ezrine recombinante et actine α. Une étude de Yao et collaborateurs (**Yao et al. 1996**) montre que de l'ezrine extraite d'un homogénat de cellules de muqueuse gastrique de lapin, n'a pas la même affinité pour l'actine β et pour l'actine α. Ces auteurs ont mesuré la constante d'affinité $K_d$ de l'ezrine pour l'actine β ($K_d$ = 46 nM). L'affinité de l'ezrine pour l'actine α est beaucoup plus faible. L'affinité est si faible qu'ils ne peuvent pas mesurer de constante d'affinité avec leur expérience. De plus, en suivant la polymérisation de l'actine pyrène en présence de cofiline (protéine qui fragmente les filaments), ils constatent que l'ezrine diminue le temps nécessaire aux filaments pour arriver à leur état stationnaire uniquement en présence d'actine β. Les auteurs pensent que l'ezrine se lie au filament et empêche la cofiline de couper les filaments. *A contrario*, en présence d'actine α, les courbes pyrènes ne sont que très peu modifiées. Une autre étude plus ancienne avait déjà observé que l'ezrine ne cosédimente avec l'actine α qu'en présence de peu de sels (**Bretscher 1983**). Cette dernière observation confirme le fait que les interactions peuvent être différentes suivant l'isoforme d'actine qui est utilisée. I*n vivo,* l'ezrine ne se trouve pas dans le muscles squelettique (qui ne contient que de l'actine *α*), mais qu'elle se trouve dans les cellules non musculaires où elle est en contact avec de l'actine β.

Dans notre cas, nous avons utilisé l'actine α. Il n'était pas possible de discriminer quelle sorte d'actine il était préférable d'utiliser sur la base de la littérature, en effet Roy et collaborateurs utilisent de l'actine α (**Roy et al. 1997**) et Janke et collaborateurs (**Janke et al. 2008**) utilisent de l'actine β. L'actine β est elle beaucoup plus difficile à purifier que l'actine α et son coût est très élevé. Il est donc plus difficile de faire de multiples expériences avec de l'actine β qu'avec de l'actine α.

Les interactions que nous avons observées en TIRF (interaction des filaments sur des agrégats de proteines et sur des billes) ne sont peut être pas totalement représentatives des effets qu'il serait possible d'avoir avec une isoforme différente d'actine (*β* et *γ*). En effet les rôles des différentes isoformes de l'actine ne sont pas les mêmes. Une étude récente de Dugina et collaborateurs (**Dugina et al. 2009**) montrent clairement que les isoformes *γ* et *β* n'ont pas les mêmes localisations cellulaires, ni les mêmes rôles dans des fibroblastes et des cellules

épithéliales. L'actine $\gamma$ serait plus impliquée dans la locomotion de la cellule alors que l'actine $\beta$ aurait un rôle plus important dans sa contractilité. Il est donc possible qu'il y ait un effet différent de l'ezrine sur la polymérisation d'actine suivant qu'elle est de muscle (α) ou de plaquettes (β).

## III.C.4 – conclusion

L'ezrine ne semble pas avoir d'activité de nucléation sur l'actine α issue de muscle. En effet les expériences en TIRF et en pyrène ne montrent pas d'activité de l'ezrine sur la dynamique de polymérisation de l'actine. Néanmoins la microscopie TIRF montre une interaction entre l'ezrine et l'actine seulement en présence de PIP2. Ceci montre que le PIP2 active bien l'ezrine en se liant sur celle-ci, et que l'ezrine est ensuite capable d'interagir avec les filaments d'actine.

Néanmoins la littérature suggère qu'il serait possible d'avoir des effets différents suivant la méthode de purification de l'ezrine et suivant l'isoforme d'actine que nous étudions. Je pense que pour comprendre totalement le rôle qu'a l'ezrine sur la polymérisation de l'actine il faudra étudier en détails (TIRF, pyrène) l'effet de la protéine sur les différentes isoformes de l'actine.

# IV – Discussion générale et conclusion

## IV.1 – Discussion générale

Mon travail de recherche a montré que la liaison de l'ezrine sur le PIP2 induit plusieurs phénomène peut décrit dans la littérature. Dans un premier temps les expériences utilisant seulement de la protéine purifiée et du PIP2 indiquent un changement conformationnel de la protéine et une multimérisation de l'ezrine dépendante du PIP2. Puis les expériences avec les GUV contenant du PIP2 ont montré que l'ezrine est capable d'interagir avec le PIP2 lorsqu'il est dans la membrane des GUV et d'induire des hétérogénéités de distribution du PIP2. Finalement, des expériences de microscopie à onde évanescentes ont montré que l'ezrine est capable de lier les filaments d'actine seulement en présence de PIP2. Comment relier toutes ces expériences entre elles et comment relier nos observations à des phénomènes cellulaires ? La figure IV.1 schématise les résultats que j'ai obtenus durant mon étude.

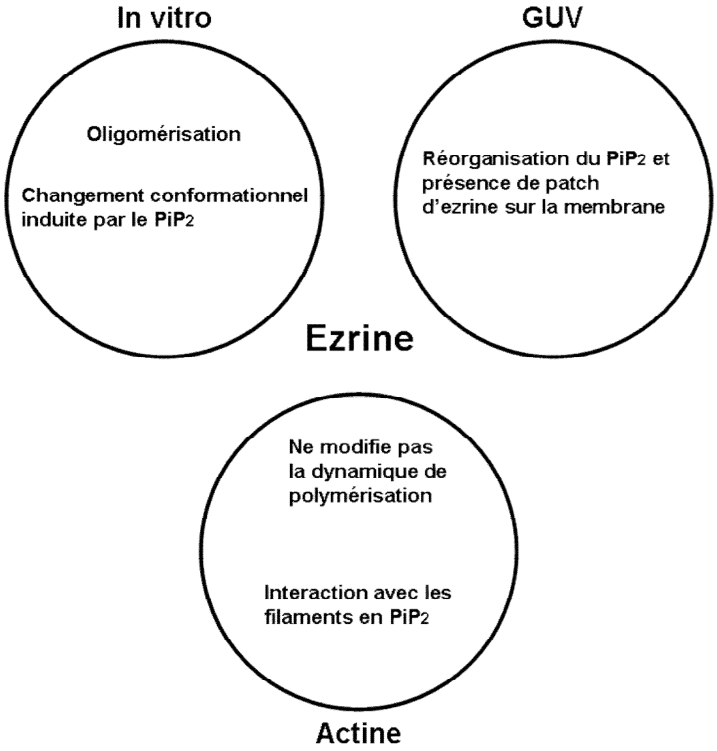



Fig VI.1. Schéma récapitulatif des principaux résultats que j'ai obtenu durant ma thèse.

Le changement conformationnel de l'ezrine qui a lieu lors de la liaison au PIP2 vient conforter le fait que le site de liaison à l'actine-F situé dans le domaine C-terminal est démasqué et donc que l'ezrine peut interagir avec les filaments d'actine. Les études que j'ai effectuées montrent que le PIP2 serait suffisant pour induire un changement conformationnel et que la présence de kinase ne serait pas nécessaire pour induire ce changement et l'activation de l'ezrine (passage de la forme « fermée » à la forme « ouverte »). Ce qui est confirmé par une étude de Fievet et collaborateurs **(Fievet et al. 2004)** qui montre que la première étape, *in vivo,* pour l'activation de l'ezrine et la liaison au PIP2. Il est probable que la présence du PIP2 n'active pas complètement l'ezrine et que la phosphorylation soit nécessaire pour maintenir la forme active.

Un des effets de la liaison de l'ezrine au PIP2 est que les protéines s'associent pour former des oligomères non compactes. Le phénomène d'oligomérisation en présence de PIP2 est observé à un niveau moléculaire, c'est-à-dire à une échelle de quelques dizaines de nanomètres (Western Blot et diffusion de lumière). Cependant, il n'est pas possible de proposer un modèle moléculaire complet expliquant l'oligomérisation de l'ezrine. La seule certitude est que le domaine FERM entre en jeu, soit par des interactions FERM / FERM ou par des interactions FERM / C-terminal. Les interactions guidant la multimérisation ne sont pas encore identifiées et l'utilisation de mutagenèse dirigée se révélera nécessaire pour identifier quels acides aminés sont importants pour l'oligomérisation.

Lors des expériences avec les GUV, nous observons une répartition non homogène de la protéine sur la membrane et donc la présence d'agrégats d'ezrine sur une échelle de quelques micromètres. La possibilité pour que les interactions entre ezrine qui soient à l'origine de l'oligomérisation, soient également à l'origine de l'apparition des patchs de protéines sur la membrane, n'est pas à exclure.

De plus, ces agrégats d'ezrine sont systématiquement colocalisés avec une zone riche en PIP2. Le processus de formation des agrégats pourraient donc induire un partitionnement du PIP2 dans la membrane. *In cellulo*, cela peut revêtir une très grande importance. En effet les zones où sont localisées l'ezrine sont généralement des zones très actives en ce qui concerne la polymérisation de l'actine (voir chapitre d'introduction). Le PIP2, comme nous l'avons vu, est primordial dans la régulation du cytosquelette. En effet, il active NWASP qui active à son tour Arp2/3 (un nucléateur de la polymérisation de l'actine). Il peut également interagir avec des ABP (« Actin Binding Proteins »). En créant des zones riches en PIP2 sur les membranes,

l'ezrine pourrait indirectement réguler la dynamique de polymérisation de l'actine *via* le PIP2 et ses nombreux partenaires.

Les expériences avec l'actine montrent que l'ezrine est capable d'interagir avec les filaments d'actine. En effet, l'ezrine lie le cytosquelette d'actine la membrane plasmique via une interaction avec le PIP2 et l'ezrine ne semble pas participer directement à la dynamique de polymérisation de l'actine. Si l'ezrine régule indirectement la polymérisation par la répartition du PIP2 dans la membrane alors les patchs d'ezrine sur la membrane peuvent servir de points d'attache pour les filaments nouvellement créés via d'autres voies (nucléation par Arp2/3 par exemple).

Une autre observation surprenante, en ce qui concerne l'interaction entre l'ezrine et le PIP2, est que l'interaction semble irréversible que ce soit en Western Blot ou bien lorsque l'ezrine est adsorbée sur la membrane des GUV. Deux phénomènes peuvent être identifiés : l'importance des chaines carbonées dans l'interaction (expérience de fluorescence du tryptophane) et la formation de multimères. De façon sure, si les chaines hydrocarbonées peuvent interagir avec le domaine FERM, alors l'affinité de l'ezrine pour les PIP2 va dépendre de l'accessibilité de ces chaines. Aussi, lorsque le PIP2 est dans une membrane fortement courbée (comme dans une LUV), l'interaction n'est plus irréversible. En outre, il est possible que sur une membrane plane, l'ezrine soit capable d'interagir avec les chaines carbonées du lipide comme cela est suspecté pour d'autres protéines **(Saad et al. 2006)**. D'autre part, la présence de multimères d'ezrine sur la membrane des GUV va également changer l'affinité de la protéine pour la membrane et donc il n'est pas impossible que dans ces conditions le temps de résidence du multimère sur la membrane soit fortement augmenté. La littérature vient appuyer cette dernière remarque car Berryman et collaborateurs (**Berryman et al. 1995**) ont observé qu'il existait de l'ezrine liée fortement au cytosquelette et qu'il était impossible de l'extraire d'une façon conventionnelle.

Les expériences et les observations issues de ma thèse me donnent quelques indices pour une vision de l'interaction *in cellulo* entre l'ezrine et le cytosquelette qui peut être la suivante (f*ig IV.2*) : l'ezrine se lie à la membrane via le PIP2, puis elle induit un partitionnement du lipide (f*ig IV.2(A) et (B)*), celui-ci modifie localement la dynamique de l'actine en stimulant la polymérisation via les « ABP » et les nucléateurs, puis les filaments nouvellement formés sont

ancrés à la membrane par l'ezrine déjà présente (f*ig IV.2(C)*) et se trouvent de fait dans les zones de forte concentration en PIP2 et ezrine.

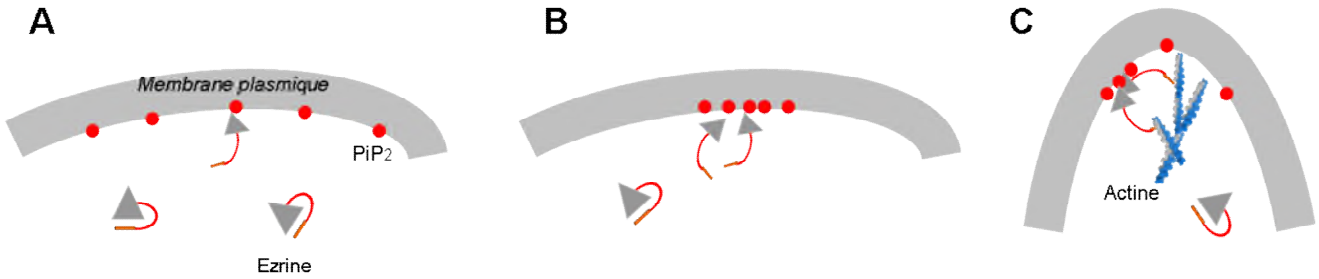



Fig IV.2. Hypothèse de régulation du cytosquelette via l'ezrine et la liaison au PIP2. (A) L'ezrine interagit avec le PIP2 dans la membrane. (B) Partitionnement du lipide et (C) Liaison aux filaments d'actine.

L'ezrine ne contrôlerait pas la dynamique, mais la localisation du PIP2 et la localisation de l'actine sous-corticale par modulation de sa liaison aux filaments.

Cette vision n'est qu'une hypothèse et les futures expériences donneront une vision plus nette de l'interaction dans un système biomimétique complet intégrant les GUV contenant du PIP2, de l'ezrine, de l'actine et de quelques ABP (gelsoline, ADF/Cofiline, profiline, nucléateur). L'actine polymérisera alors directement en contact avec les GUV sur lesquelles de l'ezrine est adsorbée (*fig IV.3*).

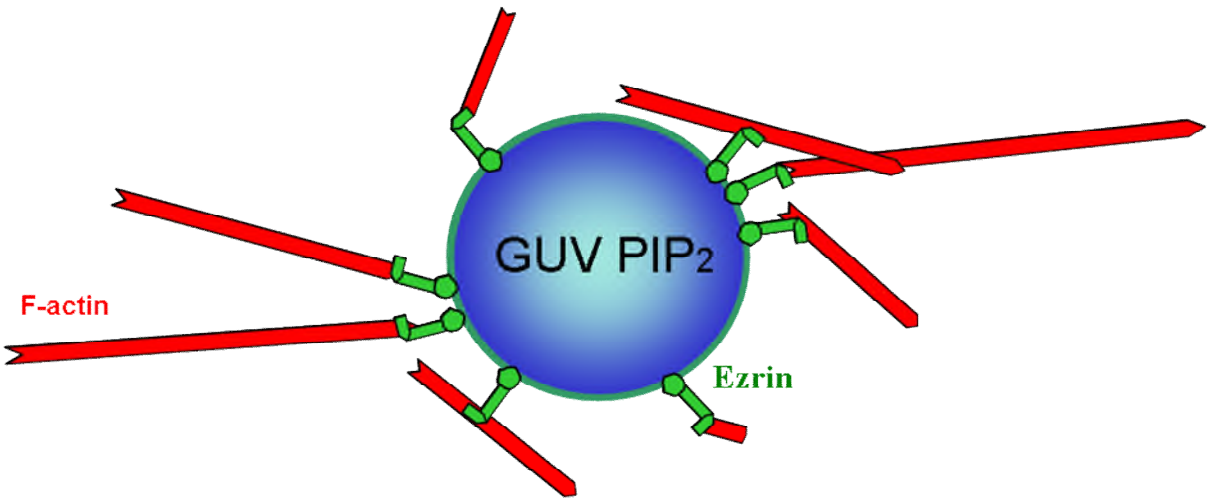



Fig IV. Schéma du système biomimétique complet intégrant tous les composants de la liaison du cytosquelette à la membrane via la voie ezrine / PIP2.

Le système permettra de voir les effets de l'ezrine sur la polymérisation de l'actine prés de la surface : une coquille d'actine va-t-elle se former autour de la vésicule ? Ou bien seulement

aux endroits où il y a des patchs de protéines ? Est-ce que la membrane va être déformée ? Est-ce que la répartition des lipides et des protéines évoluera dans le temps ?

Cependant, il reste énormément de questions auxquelles il faut répondre avant de comprendre vraiment quel est le rôle de l'ezrine dans un contexte cellulaire : comment le PIP2 interagit avec la protéine ? Quel est le mécanisme de multimérisation ?
En effet, comprendre de tels mécanismes pourra peut être ouvrir de nouvelles voies de recherche dans des domaines où certaines pathologies sont étudiées, comme le cancer par exemple. Dans le cancer, la surexpression de l'ezrine a été identifiée comme étant un marqueur métastatique **(Hunter et al. 2004)**. C'est pourquoi, comprendre comment l'ezrine influe sur l'actine et son organisation peut, déboucher, à terme sur un modèle permettant d'expliquer comment l'ezrine peut permettre aux cellules cancéreuses de devenir métastatique (invasives).

## IV.2 – Conclusion

Dans ce travail de thèse nous avions pour objectifs de caractériser les interactions entre ezrine et PIP2 et de construire un système biomimétique de GUV contenant du PIP2. Nous avons mis en place l'outil biomimétique et l'avons caractérisé complètement en termes de stabilité dans des milieux ioniques contenant ou non des ions divalents.
Ensuite, le but était de mettre les GUV en contact avec la protéine et voir quel était les effets de la liaison de l'ezrine sur la membrane en termes de répartition de lipides et de répartition de protéines.

L'interaction entre ezrine et PIP2 induit des effets inattendus (oligomérisation, irréversibilité), et peu décrits dans la littérature. Nous avons montré que l'ezrine est apte à induire un partitionnement du PIP2 dans la membrane. A l'heure actuelle il n'y a pas de pertinences biologiques claires en ce qui concerne ces observations, néanmoins à la vue de la littérature, certains indices semblent montrer que l'ezrine à un rôle plus important que celui de simplement ponter les filaments d'actine à la membrane. Et notre étude pointe le fait qu'il est peut être nécessaire de connaître précisément comment l'ezrine influe sur la forme cellulaire et sur le cytosquelette.

La suite de cette étude est actuellement en cours au laboratoire et elle tentera de répondre aux nombreuses questions que nous nous sommes posées tout au long de l'exposé. D'un point de vue personnel, ce travail m'a permis de me familiariser avec la biologie et avec les approches biomimétiques et j'ai eu la chance d'utiliser beaucoup de techniques pour observer mon objet d'étude.

# Annexe : purification de l'ezrine

Tampon de casse: 500 mL
- 50 mL PBS 1X (10X)
- 10 mL EDTA 10mM (0,5 M)
- 100 µL β-mercaptoéthanol

Tampon de dialyse: 2L
- 40 mL de Tris 20 mM pH 7,4 (1 M)
- 4 mL EDTA 1mM (0,5 M)
- 2 mL β-mercaptoéthanol

Tampon de lavage: 250 mL
- 12,5 mL de Tris 50 mM pH 7,4 (1 M)
- 5 mL NaCl 100 mM (5 M)

## 1) Préparation des différents tampons:

Tampon de casse: mettre 440 mL d'eau milliQ dans une éprouvette de 1L et la transvaser dans un erlen de 500 mL. Dans ce dernier, mettre les proportions désirées de PBS, EDTA et β-mercaptoéthanol.
Prélever 50 mL de cette solution et les mettre dans un tube Falcon de 50 mL.
Y introduire 2 comprimés d'anti-protéase et remuer de temps en temps pour les dissoudre.

Tampon de lavage: mettre 232,5 mL d'eau milliQ dans une éprouvette de 250 mL puis mettre les 12,5 mL de Tris et les 5 mL de NaCl.

Tampon de dialyse: dans une éprouvette de 2L, mettre 1954 mL d'eau milliQ puis les 40 mL de Tris, les 4 mL de EDTA et les 2 mL de β-mercaptoéthanol.

Gel GST: retirer le surnageant avec une pipette pasteur et aspiration. Remettre de l'eau milliQ, agiter, et laisser sédimenter.
Renouveler cette manipulation 3 fois.
Puis remplir le tube falcon jusqu'à 20 mL avec de l'eau milliQ pour avoir 1 volume de gel pour un volume d'eau. Mettre 40 µL de $NaN_3$.

IPTG: stockée à – 20°C sous forme de poudre. Attendre qu'elle soit à température ambiante puis peser 238 mg soit 119 mg/L.

Toutes les solutions et le IPTG sont mis à 4°C. L'éprouvette de 2L de tampon de dialyse est mis sous agitation dans la chambre froide.

## 2) Fragmentation des bactéries:

- Préparer 2L de milieu LB soit 2 fois 5g de NaCl, 5g d'extrait de levure, 10g de tryptome et 1L d'eau milliQ. On peut également mettre 20 comprimés de milieu LB par litre de solution.
- Mettre 2 fois 1L de milieu LB, chacun dans un erlen de 2L et stériliser l'erlen à l'autoclave.
- Le soir, mettre 1 mL d'ampicilline à 100 mg/mL par litre de milieu LB.

- Près d'une flamme, ouvrir l'erlen et le flamber. Flamber également une pince pour la stériliser.
- Prendre un cure-dent à l'aide de la pince et prélever une colonie qu'on introduit dans l'erlen.
- Laisser pousser à 37°C, toute la nuit sous agitation (100 à 200rpm).

- **Le matin**, allumer les 2 centrifugeuses (Beckam JG-MC et Sovall RC-SC) pour les stabiliser à 4°C.
- Reprendre les 238 mg d'IPTG (il piège le répresseur ce qui permet une induction du promoteur en aval) dans 2 mL d'eau milliQ et les ajouter au milieu LB.
- Remetrre les erlens dans l'incubateur sous agitation pendant 1 heure.
- Mettre les tampons dans la glace pendant les manipulations.
- **Au bout d'une heure**, vider le contenu de chaque erlen dans une bouteille de 1L adaptée à la centrifugeuse.
- Les centrifuger à 4°C pendant 15 minutes à 4000 tours.
- Équilibrer les 2 bouteilles.
- Les mettre l'une en face de l'autre dans la centrifugeuse.
- Vider le surnageant dans erlen où on a fait pousser les bactéries et mettre de l'eau de javel.
- Sur chaque culot, ajouter 15 mL de tampon de casse à 4°C.
- Reprendre le culot par alternance aspiration/rejet plusieurs fois.
- Le mettre dans un falcon de 50 mL à 4°C.
- Rincer la sonde de sonication avec de l'eau distillée.
- Lancer le programme voulu. Ici, on appuie sur « recall » puis « 1 » puis « enter » puis « start ».
- Vérifier que la sonde soit bien dans la solution et qu'elle ne touche pas le tube.
- Soniquer dans la glace toutes les 5 seconde pendant 4 minutes. Mettre 3 hauteurs différentes de sonde dans le culot et soniquer 3 fois (on sonique donc 3 fois 2 minutes).
- Augmenter la puissance jusqu'à arriver à un plateau (entre 15 et 20 % de la puissance maximale).
- On obtient environ 20 mL de bactéries fragmentées.
- Les mettre à centrifuger dans un tube de 40 mL mis préalablement dans la glace.
- Y ajouter tout le tampon de casse pour diluer les bactéries et les remplir au ¾ avec du tampon de casse conservé dans la chambre froide.
- Les mettre à tourner 30 minutes à 18000 tours dans le rotor (SS 34).
- Verser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml et le remplir avec du tampon de casse.

### 3) Purification et quantification de l'ezrine:

- Prélever un aliquote du lysat et le mettre dans le sample buffer (tampon échantillon) de
- l'électrophorèse.
- Ajouter 2 mL de gel GST au lysat et le mettre à tourner sur une roue dans la chambre froide pendant 2 heures à 4°C pour éviter la polymérisation de l'agarose.
- Puis verser le gel dans la colonne préalablement rincée à l'eau milliQ.
- Récupérer les 1ères fractions du lysat dans un tube eppendof.
- Ajouter 50 µL de tampon échantillon.
- Vider tout le lysat dans la colonne. On voit le gel sédimenter au fond de la colonne.
- Laver le tube contenant le lysat avec du tampon de casse pour tout récupérer.
- Avec une pipette pasteur bouchée, mélanger le gel.
- Mettre du tampon de lavage et mesurer la DO de la 1ère fraction.
- Relaver si forte DO.
- Après lavage, récupérer plusieurs fractions et mesurer leur DO. Elle doit être proche de 0.
- Mettre du tampon de casse dans la colonne pour récupérer tout le gel, d'abord doucement puis

de manière rapide pour bien mélanger le gel.
- Répéter l'opération 3 fois.
- Dans tampon de lavage, peser la glutathione (20mM) et en déposer 1 mL sur le gel (10 mM glutathione au final).
- Diluer la glutathione stock pour avoir une solution à 10mM et en mettre 2 mL sur le gel. On a donc 3 mL de phase aqueuse et 1 mL de gel.
- Incuber 1h30 à température ambiante et agiter le gel en suspension avec une pipette pasteur bouchée.
- Enlever le bouchon et mettre un tube en-dessous: on récupère la 1ère fraction de 3 mL.
- Éluer 5 ou 6 fois par fraction de 1 mL (ajouter 1 mL de glutathione à 10mM) et mesurer la DO de chaque fraction de la plus diluée à la moins diluée.
- On a mesuré la quantité d'ezrine.
- Sélectionner une ou plusieurs fractions pour la suite.
- On les dialyse dans 2L de tampon de dialyse toute la nuit:
    1. Découper une longueur suffisante pour fermer le boudin à dialyse correctement.
    2. Mouiller le boudin dans de l'eau milliQ.
    3. Mettre une pince à une des extrémités du boudin (pas trop bas).
    4. À l'aide d'une pipette pasteur, verser les fractions sélectionnées dans le boudin.
    5. Fermer le boudin à l'autre extrémité.
    6. Le mettre dans le tampon de dialyse.
- **Le matin**, récupérer le contenu de la dialyse et mesurer son volume.
- Faire en sorte qu'il y ait 50 mM de NaCl, 2,5 mM de CaCl2 et 1 mM de DTT.
- Mettre 100 µL de thrombine qui va couper entre la GST et l'ezrine et la laisser 1h30 à 37°C.
- Mettre dans un tube eppendorf un volume de la digestion.
- Ajouter du tampon échantillon.
- Dans la digestion, mettre un volume de tampon A pour un volume de digestion.
- Filtrer la solution avec un swinex de 0,2 microns, dans un tube falcon de 50 mL.

### 4) FPLC :

- Programmer la FPLC.
- Mettre des tubes dans le collecteur puis des tubes eppendorf dans ces derniers.
- Régler le 0 de l'enregistreur.
- Dans un bécher, mettre du tampon A.
- Injecter du tampon A dans la colonne.
- En manuel, régler 0% de B et 1 mL/min.
- Mettre 5 mL de la solution dans la seringue sur la colonne.
- Passer en « inject ».
- Attendre que la DO passe à 0 pour faire les infections suivantes : passer en « load », injecter puis passer en « inject ».
- Dès que la DO change, mettre le tuyau du collecteur dans un tube falcon pour récupérer la GST.
- Lancer le mode automatique : 7 puis do/store.
- Quand toute la GST est récupérée, mettre le tuyau dans le collecteur.
- Pour ce programme, il y a 20 mL de lavage avant de récupérer de l'ezrine.
- Mesurer la DO des fractions d'ezrine récupérées.

### 5) Migration sur gel :

- Mettre 15 µL de chaque fraction et 5 µL de tampon échantillon dans un tube eppendorf.

- Prendre 15 µL de GST récupérée et y ajouter 5 µL de tampon échantillon.
- Mettre les fractions à 95°C pendant 3 minutes en prenant soin de maintenir les eppendorf fermés avec un poids.
- Faire migrer ces fractions.
- Une fois que les fractions ont migré, colorer les gels dans du bleu de Comassie pendant 1 heure.
- Puis les tremper dans un tampon de décoloration pendant 1 heure.
- Photographier le gel.

# Articles 1 – Biophysical Journal 2008

Biophysical Journal Volume 94 February 2008 1021–1033



## Quantitative Analysis of the Binding of Ezrin to Large Unilamellar Vesicles Containing Phosphatidylinositol 4,5 Bisphosphate

Guillaume Blin,* Emmanuel Margeat,† Kévin Carvalho,* Catherine A. Royer,† Christian Roy,* and Catherine Picart*

*DIMNP, Universités Montpellier II et I, CNRS, Montpellier cedex 05, France; and †Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale Unité 554, and Université Montpellier, Centre National de Recherche Scientifique, UMR 5048, Centre de Biochimie Structurale, Montpellier, France

ABSTRACT The plasma membrane-cytoskeleton interface is a dynamic structure participating in a variety of cellular events. Among the proteins involved in the direct linkage between the cytoskeleton and the plasma membrane is the ezrin/radixin/moesin (ERM) family. The FERM (4.1 ezrin/radixin/moesin) domain in their N-terminus contains a phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate ($PIP_2$) (membrane) binding site whereas their C-terminus binds actin. In this work, our aim was to quantify the interaction of ezrin with large unilamellar vesicles (LUVs) containing $PIP_2$. For this purpose, we produced human recombinant ezrin bearing a cysteine residue at its C-terminus for subsequent labeling with Alexa488 maleimide. The functionality of labeled ezrin was checked by comparison with that of wild-type ezrin. The affinity constant between ezrin and LUVs was determined by cosedimentation assays and fluorescence correlation spectroscopy. The affinity was found to be ~5 $\mu$M for $PIP_2$-LUVs and 20- to 70-fold lower for phosphatidylserine-LUVs. These results demonstrate, as well, that the interaction between ezrin and $PIP_2$-LUVs is not cooperative. Finally, we found that ezrin FERM domain (area of ~30 $nm^2$) binding to a single $PIP_2$ can block access to neighboring $PIP_2$ molecules and thus contributes to lower the accessible $PIP_2$ concentration. In addition, no evidence exists for a clustering of $PIP_2$ induced by ezrin addition.

### INTRODUCTION

The plasma membrane-cytoskeleton interface is a dynamic structure, participating in a variety of cellular events including cell shape and motility, signal transduction, and cell polarization. Among the proteins involved in the linkage between components of the cytoskeleton and the plasma membrane, the proteins of the ezrin/radixin/moesin (ERM) family are recognized as being important regulators in the connection between membrane proteins and the cytoskeleton (1,2,3).

ERM proteins are organized in three distinct domains: i), the N-terminal membrane-binding domain is shared by the ERM proteins and by protein 4.1 and is referred to as the FERM domain (1); ii), an $\alpha$-helical domain; and iii), the C-terminal actin-binding domain. Ezrin, one member of this family, is largely found in intestinal microvilli and in filopodia (4). Within the cell, ezrin can exist in two different states: either dormant, or inactive, when the N- and C-terminal domains are tightly associated thereby masking the F-actin and membrane binding sites (via intra- or intermolecular association) (5) or open, i.e., active, when the N-terminus is effectively accessible for membrane binding and the C-terminus is accessible for actin binding (Fig. 1).

The main pathway for activation of ezrin relies on the interaction of ezrin with phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate ($PIP_2$) in the membrane, followed by phosphorylation of the Thr-567 residue in the C-terminal domain, resulting in a conformational change of the protein (1,6,7). The first direct evidence for ezrin binding to $PIP_2$ came from Niggli et al. (8), who demonstrated that the N-terminal domain of ezrin (amino acids 1–309) was necessary and sufficient for interaction with $PIP_2$-containing multilamellar vesicles. In that study, it was shown that ezrin binds preferentially to liposomes containing $PIP_2$ as compared to other lipids such as phosphatidylserine and that this interaction occurred at physiological ionic strength. Under these conditions, ezrin could discriminate between $PIP_2$, phosphatidylinositol-4-monophosphate, and phosphatidylserine (8). Unfortunately, multilamellar vesicles cannot be used for quantitative binding analysis because of their ill-defined geometry.

The first insights into the structural basis for the membrane interaction of ERM proteins via their FERM domain came from the study of Barret et al. (7). These authors demonstrated that the interaction of ezrin with multilamellar vesicles and with cell membrane was almost abolished by mutagenesis of specific residues located in subdomains F1 and F3 of the FERM domain. The second line of evidence came from the determination of the x-ray crystal structure of the radixin FERM domain complexed with $IP_3$ (9). These results revealed the important role of residues in a basic cleft located between subdomains F1 and F3 (9). In addition, it was found that these two subdomains form a relatively flat molecular surface that seems to maximize the interactions with the membrane surface.

In a recent study, Charras et al. demonstrated that, after expansion of a bleb, ezrin was the first protein recruited to the membrane, followed by actin, actin-bundling proteins, and, finally, contractile proteins (10). In addition to its $PIP_2$-dependent location at the plasma membrane, ezrin may be itself involved in the process of membrane deformation. This

*Submitted April 5, 2007, and accepted for publication August 22, 2007.*

Address reprint requests to Catherine Picart, E-mail: catherine.picart@univ-montp2.fr.

Editor: Anthony Watts.

© 2008 by the Biophysical Society

0006-3495/08/02/1021/13 $2.00

doi: 10.1529/biophysj.107.110213

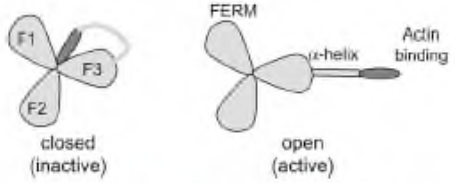



FIGURE 1 Scheme of the two possible conformations for ERM proteins, (*left*) inactive (or closed) conformation and (*right*) open (or active) conformation. The three lobs represent the FERM domain (subdomain A composed of *F1*, *F2*, and *F3*), the long rectangle represents the central helical region (subdomain B), and the C-terminal domain is the actin-binding region (*ellipsoid*).

is suggested by a recent investigation on ezrin with giant unilamellar vesicles, where ezrin and moesin, similarly to protein 4.1, were found to open stable holes in vesicles containing an acidic lipid (11). All these findings suggest that $PIP_2$, which represents ~10% of all the phosphoinositides species and ~1% of the total lipid in cell membranes (12), is an important determinant for ezrin morphogenic actions (13,14).

A useful model for investigating protein/lipid interactions is that of large unilamellar vesicles (LUVs) because these objects can be employed to quantitatively determine the association constant of a given protein for a membrane. Several more or less conventional methods are used to achieve this goal, as reviewed by Cho et al. (15). Among them are the quantitative cosedimentation assays using either unlabeled protein (16), radioactive protein or fluorescently labeled protein (17), surface plasmon resonance (18), and more recently fluorescence correlation spectroscopy (19,20).

In this study, our goal was to quantify the binding of ezrin to LUVs by means of cosedimentation assays and fluorescence correlation spectroscopy. In particular, we wanted to quantify the binding of ezrin to LUVs containing $PIP_2$ in comparison with LUVs containing other acidic lipids such as phosphatidylserine (PS) and other phosphoinositides. We also wanted to determine whether the binding is cooperative, and whether $PIP_2$ is relocalized upon binding to ezrin. The influence of the $PIP_2$ content in the membrane upon ezrin binding, both at fixed lipid concentration or at increased lipid concentration were investigated. Experiments were performed with either unlabeled ezrin, or an engineered ezrin bearing a free cysteine residue labeled with Alexa488 maleimide.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and buffer

Dimethyl sulfoxyde (DMSO) and dithiothreitol (DTT) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine) (POPC) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylserine (POPS) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The ammonium salt of L-α-phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate ($PIP_2$) was purchased from Lipid Products (Surrey, Great Britain). D-*myo*-phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P), D-*myo*-phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PI(3,4)$P_2$), and D-*myo*-phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI(3,4,5)$P_3$), Bodipy-TMR-PI(4,5)$P_2$, (TMR-$PIP_2$, reference C-45M16a), NBDC16-$PIP_2$ (or NBD-$PIP_2$, reference C-45N16a), Bodipy-FL-PI(4,5)$P_2$ (Bodipy-FL-$PIP_2$, reference C-45F16a) were purchased from Echelon Biosciences (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France), rhodamine DHPE from Molecular Probes (Eugene, OR) and α-methoxy-ω-carboxylic acid succinimidyl ester poly(ethylene glycol) (PEG, molecular weight of 5000) from Nektar Therapeutics (Birmingham, AL). The MARCKS (151–175) peptide was kindly provide by Prof. S. McLaughlin from Stony Brook University (Stony Brook, NY). All buffer solutions were prepared with deionized water (resistivity 18.2 MΩ/cm). Ezrin was kept at 4°C in an ezrin buffer containing 70 mM NaCl, 25 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) at pH 6.2 (MES-NaCl buffer). For the binding experiments using the cosedimentation assay, the vesicles were prepared in a Hepes buffer containing 200 mM sucrose, 20 mM HEPES, 0.5 mM EGTA at pH 7.4 (Hepes-sucrose buffer). All other binding experiments (including fluorescence correlation spectroscopy (FCS) experiments) were performed in a Hepes buffer containing 100 mM KCl, 20 mM HEPES, 0.5 mM EGTA at pH 7.4 (Hepes-KCl buffer). For pegylation, PEG was dissolved in sodium borate 0.1 M at pH 8.5 (borate buffer).

### Protein expression and purification

The expression and purification of wild-type (WT) ezrin cloned in the pGEX 2-T vector have already been described (21). Ezrin has only two cysteine residues that are indeed inaccessible. Thus, for labeling ezrin with a fluorescent maleimide derivative, an additional cysteine was added at the C-terminal of the molecule after two extra glycine residues (GGC). The quick change site-directed mutagenesis kit from Stratagene (Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands) was used for this purpose. Constructions were verified by sequencing. Both wild-type ezrin and ezrin-cysteine were obtained using the same purification procedure. The diameter of ezrin and of ezrin-cysteine in the MES-NaCl buffer were measured using a Malvern nanosizer (Malvern, Worcestershire, UK).

### Ezrin labeling

Labeling of ezrin-cysteine was performed using Alexa488-C5-maleimide (Molecular Probes). Purified ezrin conserved in MES-NaCl buffer was treated with a 10-fold molar excess of Alexa488-C5-maleimide (dissolved in 10 μl DMSO) for 1 h and 30 min at room temperature in ezrin buffer. The labeling reaction was subsequently quenched by adding an excess amount of DTT and the labeled protein was separated from the reagents using a Sephadex G25 column (GE Healthcare, France) eluted with the MES-NaCl buffer. The labeling efficiency of ezrin was estimated by determining the respective molar concentration of dye and of protein (molar absorptivity of Alexa488 at 495 nm is $\varepsilon = 72{,}000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ and molar absorptivity of ezrin at 280 nm is $\varepsilon = 69{,}000\ M^{-1}$) and calculating the grafting ratio. Under our labeling conditions, ~0.93 mol of Alexa488 was incorporated per mol of ezrin.

### Vesicle preparation

LUVs were prepared by drying the appropriate lipid mixture in a Speedvac rotary evaporator overnight, hydrating the lipids in the Hepes-KCl buffer for 2 h at 37°C (interrupted by rigorous vortexing every quarter of hour), then extruding the multilamellar vesicles through a stack of two polycarbonate filters (100-nm pore size diameter, 21 passages) using the miniextruder from Avanti Polar Lipids (22). LUVs were extruded and stored at high concentration (14 mM, total lipid concentration or 7 mM accessible lipid concentration; taking into account that only the outermost layer of the bilayer membrane is accessible) for no more than 2 weeks. Final concentrations of lipids were measured using the Phospholipid B kit (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) and were within 90–95% of the expected concentration.

## $\xi$-Potential measurements

The homogeneity in size and in charge of the vesicles was checked, respectively, by diffusion light scattering (DLS) and by $\xi$-potential measurements on a Malvern Zeta Sizer NanoZS (Malvern). The electrophoretic mobility of LUVs was measured at low vesicle concentration in a 50 mM KCl, 2 mM Hepes, 0.5 mM EGTA buffer at pH 7.4 and the $\xi$-potential, which is the electrostatic potential at the shear plane, was calculated using the Helmholtz-Smoluchowski (Eq. 1) (23):

$$\xi = \frac{u\eta}{\varepsilon_R \varepsilon_0}, \tag{1}$$

where $\xi$ is the $\xi$-potential of a vesicle (in mV); $u$ is the velocity of the vesicle in a unit electric field; $\eta$ is the viscosity of the aqueous solution; $\varepsilon_R$ is the dielectric constant of the aqueous solution; and $\varepsilon_0$ is the permittivity of free space. The $\xi$-potential is proportional to the surface charge density (23). Results are given as mean ± SD of 20 measurements on the same sample.

## Cosedimentation assays

Ezrin affinity for phospholipids was determined by sedimentation assays with sucrose loaded LUVs. LUVs were dialyzed using a microdialyzer (Pierce, Rockford, IL) against Hepes-KCl buffer or, when possible, they were directly diluted in the Hepes-KCl buffer. The cosedimentation assays were achieved by varying the concentration of total lipids or, for a fixed lipid concentration, varying the percentage of PIP$_2$ in the LUVs. For these experiments, ezrin concentration was kept constant at 400 nM. In another set of experiments, ezrin concentration was varied over a large range (from tens of nanomolars to tens of micromolars) but lipid concentration was fixed to a certain value. After incubation for 15 min at room temperature, the 100-$\mu$l samples were centrifuged at 223,000 × $g$ for 1 h at 4°C using the 42.2Ti rotor (Beckman Coulter, Roissy, France). The top 80 $\mu$l of each sample were removed and considered as supernatant (SN); 8 $\mu$l of Triton X100 and 52 $\mu$l of KCl buffer were added to resuspend the pellet (P). For experiments with labeled ezrin, SN and P intensities were directly read in a 50-$\mu$l microcuvette using the LS55 spectrofluorimeter (Perkin Elmer, Waltham, MA) with excitation and emission slits set, respectively, at 488 and 519 nm (±2.5 nm). Alternatively, for experiments performed using unlabeled ezrin, SN and P were analyzed on a 10% SDS-PAGE, transferred on an Immobilon-P transfer membrane (Millipore, Molsheim, France) and the membrane stained using Coomassie blue for quantification. Membranes were scanned and images were analyzed using Image J 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, MD) (the mean density of each band was background corrected and we checked that band intensities were in the linear range of the scanner). Since 20 $\mu$l of the supernatant were counted as pellet and since the supernatant and pellet resuspension volume were identical, the true pellet intensity was calculated using the formula: $I_{Pellet} = I_P - 0.25 I_{SN}$, where $I_P$ and $I_{SN}$ are the intensity of the pellet and supernatant, respectively. The corresponding percentage of ezrin bound was deduced (percentage of ezrin bound is $I_{Pellet}/(I_P + I_{SN})$).

## Affinity determination

The binding of protein to lipid bilayers can be described by defining an apparent association constant, $K$, as described previously (24). $K$ is the proportionality constant between the fraction of proteins bound to the membrane, $[Ez]_B$, and the molar concentration of the protein in the bulk aqueous phase, $[Ez]_F$.

The fraction of ezrin bound is given by:

$$\frac{[Ez]_B}{[Ez]_T} = \frac{K[PIP_2]_{ACC}}{1 + K[PIP_2]_{ACC}}, \tag{2}$$

where $[Ez]_T$ is total ezrin and $[PIP_2]_{acc}$ is the accessible PIP$_2$ concentration. It is assumed here, in a first approximation, that all PIP$_2$ on the outer leaflet is accessible. The association constant $K$ deduced from Eq. 2 is the reciprocal of the apparent dissociation constant, which is often called the affinity constant $K_d$.

## Fluorescence correlation spectroscopy measurements

Fluorescence correlation spectroscopy measurements were carried out on a two-photon FCS setup. Excitation was carried out with a tunable femtosecond infrared titanium sapphire laser (MaiTai from Spectra-Physics, Newport, Irvine, CA) set at 780 nm and 15 mW with a polarizing beamsplitter and one-half wave-plate (Karl Lambrecht, Chicago, IL). The excitation light was coupled to a Zeiss (Jena, Germany) Axiovert 200 M microscope, reflected by a Chroma (Rockingham, VT) 700DCSXR dichroic mirror, and focused onto the sample with a Zeiss Apochromat 63× 1.4 NA immersion objective. Emitted photons were detected through an infrared blocking filter (Chroma 700SP) with a dual channel ISS ALBA fluorescence correlation detector with avalanche photodiodes, with a Chroma Q565LP dichroic mirror to separate the red and green emissions, and a Chroma HQ610/75 and HQ525/50 bandpass filter for the two channels (rhodamine and Alexa 488, respectively). To prevent nonspecific adsorption of ezrin, PEGylation of the glass slide (thickness 170 $\mu$m) was performed following a protocol that has been described elsewhere (25) using Vectabond in a first step and PEG-succinimidyl ester in a second step. A silicone insulator (P24742, Molecular Probes) glued to the glass slides was used to prepare several wells, which were filled with 10 $\mu$l of sample. For all the FCS measurements, 10 $\mu$l of sample was deposited in each well. For the ezrin/LUVs interactions studies, ezrin-Alexa488 was used because Alexa488 is an excellent fluorophore for FCS measurements; it has low triplet state excitation, a high quantum yield, and high photostability (26). Also, attaching a rather hydrophilic fluorophore should not significantly affect the molar partition coefficient of the protein, in contrast to what was observed for hydrophobic fluorescent probes (like Texas red) attached to small peptides (27). For each experimental condition, the fluorescence fluctuation signal (i.e., the fluorescence signal detected in the small open volume defined by two-photon excitation probability) was measured at seven different locations in each well, for the labeled protein alone (15 nM) and for samples containing ezrin in contact with LUVs at increasing lipid concentration. The intensity fluctuations are time correlated to generate an autocorrelation function $G(\tau)$, defined as:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \tag{3}$$

with $\tau$ being the lag time. Generally the fluorescence fluctuations can be considered to arise from concentration fluctuations within the effective volume, and a translational diffusion time, $\tau_d$, can be extracted from the autocorrelation profile:

$$G(\tau) = \frac{1}{N}\left(1 + \frac{\tau}{\tau_d}\right)^{-1}\left(1 + \frac{r_o^2 \tau}{z_o^2 \tau_d}\right)^{-\frac{1}{2}}, \tag{4}$$

where $N$ is the average number of molecules in the observation volume, and $r_0$ and $z_0$ the waist and height of the volume that are given by the three-dimensional Gaussian expression for the intensity profile:

$$V_{psf} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} (r_o^2 z_o). \tag{5}$$

The effective volume was calibrated from measurements using 60 nM fluorescein assuming a diffusion coefficient 300 $\mu m^2/s$ in terms of the volume derived from the intensity profile (the point-spread function), $V_{psf}$, such that:

$$G(0) = \frac{\gamma}{\langle C \rangle V_{psf}}, \tag{6}$$

where $\langle C \rangle$ is the mean concentration of molecules and $\gamma$ a factor. It provides a measure of the uniformity of the fluorescence intensity observed for molecules at different positions within the volume and the abruptness of the boundaries. Its value is taken to be $-0.7$.

In the case of the ezrin/LUVs system, the autocorrelation function can be analyzed in terms of the diffusion times of the bound and free species, and their respective fractional populations.

$$G(\tau) = \frac{1}{N}\left(\left(F_f\left(1+\frac{\tau}{\tau_{df}}\right)^{-1}\left(1+\frac{r_o^2\tau}{z_o^2\tau_{df}}\right)^{-\frac{1}{2}}\right) + \left(F_b\left(1+\frac{\tau}{\tau_{db}}\right)^{-1}\left(1+\frac{r_o^2\tau}{z_o^2\tau_{db}}\right)^{-\frac{1}{2}}\right)\right), \quad (7)$$

where $F_f$ and $F_b$ are the fractions of the free and bound species, respectively, and $\tau_{df}$ and $\tau_{db}$ their respective diffusion times. Data analysis was performed with the ISS Vista software. This program uses a Marquardt-Levenberg minimization algorithm and the goodness of the fittings can be judged by the recovered $\chi^2$. The series of autocorrelation curves were pooled (one curve for each lipid concentration) and were globally analyzed (linked analysis) with two diffusion coefficients (one for the free protein, one for the bound protein) (28). This analysis yielded the percentage of bound ezrin, which was finally plotted as a function of the total accessible $PIP_2$ concentration for determination of the dissociation constant (Eq. 2). All experiments were performed at least three times with different LUVs and ezrin preparations.

### Fluorescence quenching experiments

Self-quenching was measured using the LS55 spectrofluorimeter (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Two different probes (NDB, excitation 472 nm/emission 529 nm, and Bodipy-TMR, excitation 547 nm/emission 570 nm) were used. The emission intensities were collected as unlabeled ezrin was added to the solution containing the LUVs. The following equation was used to calculate the percentage of quenching:

$$\%\,\text{of quenching} = \left(1-\frac{I_P}{I_0}\right)\times 100, \quad (8)$$

where $I_p$ is the intensity of fluorescence emitted from labeled LUVs in the presence of ezrin, and $I_0$ is the intensity of fluorescence emitted from labeled LUVs in the absence of ezrin. The quenching experiments were performed with vesicles containing fluorescent lipids present at the maximal molar fractions that did not exhibit appreciable self-quenching (4% for NBD lipids and 1% for Bodipy-TMR $PIP_2$ in the LUVs). This amount of self-quenching due to the proximity of neighboring NBD lipids was determined by comparing the fluorescence intensity of LUVs containing increasing percentages of NBD lipids (from 0 to 6% of NBD-PC) and of the same lipids after perturbation of the LUVs membrane by addition of 1% Triton X100. The total lipid concentration was 40 $\mu$M for 99:1 PC/TMR-$PIP_2$ and 30 $\mu$M for 96:4 PC/NBD-$PIP_2$ LUVs, respectively. These concentrations are sufficiently high to bind up to 70% of $PIP_2$ when ezrin concentration is $\sim 6$ $\mu$M.

## RESULTS

### Preparation of LUVs containing various amounts of PI(4,5)$P_2$ and containing other phosphoinositides

The homogeneity in size and in charge of the vesicles was checked, respectively, by diffusion light scattering measurements (data not shown) and by $\zeta$-potential measurements. As $PIP_2$ is highly negatively charged, the lowering in the $\zeta$-potential was measured when $PIP_2$ concentration is increased in the LUVs. The $\zeta$-potential of LUVs containing an increasing percentage of $PIP_2$ is shown in Fig. 2. It steadily decreases when the mass percentage of $PIP_2$ is increased, suggesting a uniform distribution of $PIP_2$ in the vesicles for the different preparations. This is a proof for the effective incorporation of $PIP_2$ in the LUVs in proportion to the percentage initially incorporated in the lipid mixture before the dehydration step. Indeed, the effective incorporation of the other phosphoinositides (respectively PI(4)P, PI(3,4)$P_2$, and PI(3,4,5)$P_3$) and of PS was confirmed by $\zeta$-potential measurements on LUVs containing either 5% of the phosphoinositides and 20% of PS (see Table 2). As expected based on the molecular structures of the phosphoinositides headgroups, the $\zeta$-potentials are in the order $PI(3,4,5)P_3 < PI(3,4)P_2 \sim PIP_2 < PI(4)P$ and LUVs containing 5% of $PIP_2$ are slightly less negative than those containing 20% of PS ($-24.5$ mV as compared to $-27.7$ mV). This is in agreement with previous reports on $\zeta$-potential of multilamellar vesicles containing PS (29) and $PIP_2$ (30).

### Quantification of ezrin binding to $PIP_2$ using cosedimentation assays

We determined the dissociation constant, expressed in terms of accessible acidic phospholipid ($K_d$), for the interaction between ezrin and LUVs of varying acidic phospholipid content. In a first set of experiments, quantitative cosedimentation assays on ezrin were performed. The concentration of protein (400 nM) was chosen to ensure: i), that the binding sites on the LUVs were not saturated; ii), that the ratio of protein to lipids is low; and iii), that the detection

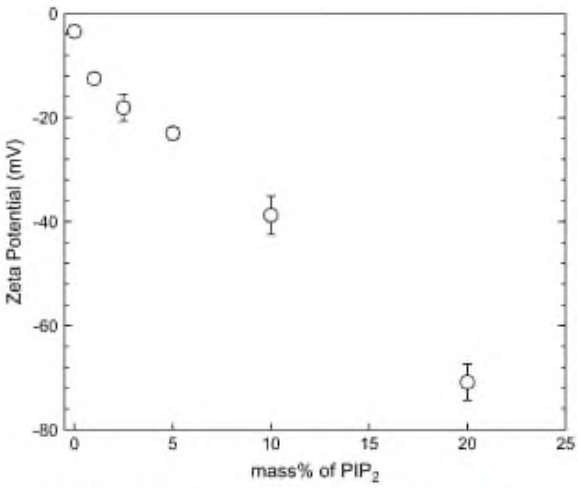



FIGURE 2 $\zeta$-Potential of unilamellar vesicles as a function of the mass percentage of $PIP_2$ in the LUVs. The electrophoretic mobility of the LUVs was measured and the $\zeta$-potential was calculated according to Eq. 1. The $\pm$ SEs are calculated from 20 measurements on each sample.

levels on stained membranes or via spectrofluorimetry were adequate. The experiments were performed with LUVs composed of phosphatidyl choline (PC) and the acidic phospholipid PIP$_2$ or phosphatidyl serine (PS), PIP$_2$ having a higher negative charge per molecule than PS (about −3 for PIP$_2$ versus −1 for PS (30)). For WT ezrin, supernatant, and pellets were analyzed by SDS-PAGE followed by transfer on membranes, staining, and subsequent image analysis. Typical images of membranes representing the pellets and the supernatants of the PC/PIP2 LUVs (95:5) that have been cosedimented with ezrin (400 nM) are shown in Fig. 3 *A* for increasing accessible lipid concentration (from 10 $\mu$M to 2.2 mM). In Fig. 3 *B*, the percentage of ezrin bound is represented as a function of the accessible acidic lipid concentration for LUVs containing either PIP$_2$ at 5% or PS at 20%. For comparison, LUVs made of pure PC are also shown. The binding of ezrin to LUVs increases when the concentration of LUVs is increased. The fit of the experimental data using Eq. 2 leads to $K_d = 5.9 \pm 0.7$ $\mu$M for LUVs containing 5% PIP$_2$ and $47.3 \pm 8.3$ $\mu$M for LUVs containing 20% PS, which is an approximately eightfold lower affinity (Table 1). Ezrin interaction with PC LUVs is negligible.

Ezrin-cysteine was used as well for analysis on membranes and results show that both type of ezrin present similar behavior, which indicated the mutation does not interfere with the binding of ezrin to the vesicles (see Supplementary Fig. S1). The binding of ezrin-Alexa488 to LUVs as measured by the cosedimentation assay followed by spectrofluorimetry analysis is represented in Fig. 4. By this method, we found that ezrin-Alexa488 binds to LUVs composed of PC and 5% PIP$_2$ with $K_d = 4.0 \pm 0.5$ $\mu$M and to LUVs composed of PC and 20% PS with $K_d = 63.8 \pm 10.5$ $\mu$M, which is ~16-fold lower affinity (Table 1). Thus, WT ezrin and ezrin-Alexa488 were found to behave similarly as these data are in good agreement with those obtained by cosedimentation and analysis on membrane. This also quantitatively confirms the previous finding that ezrin has binding specificity for PIP$_2$ over PS (8).

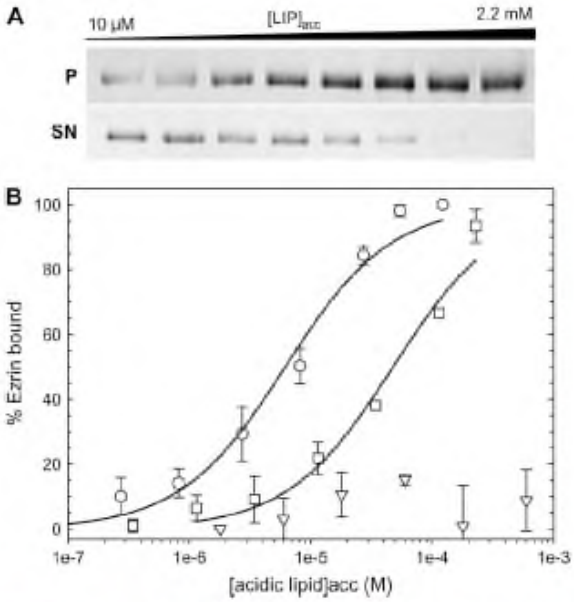



FIGURE 3 Binding of wild-type ezrin to LUVs as measured by the cosedimentation assay. Pellet and supernatants were migrated on gels and then transferred to membranes, stained with Coomassie blue for visualization and quantification. (*A*) Images of the membranes corresponding to the binding of ezrin to 95:5 PC/PIP$_2$ LUVs (from *left to right*, increasing accessible lipid concentration from 10 $\mu$M to 2.2 mM); P corresponds to the pellet and SN to the supernatant. Ezrin was kept constant at 400 nM. (*B*) The percentage of ezrin bound is represented at different acidic lipid concentrations (○) (PC/PIP2, 95:5), *x* axis is the PIP2$_{acc}$ concentration; (□) (PC/PS, 80:20), *x* axis is the PS$_{acc}$ concentration; (▽), PC 100%, *x* axis is the accessible lipid concentration. The curves are the least squares fits of Eq. 2 to the data, which yield the value for the molar partition coefficient *K* from which the affinity constant $K_d$ ($K_d = 1/K$) can be deduced (points are mean ± SD of three independent experiments).

## Ezrin LUV interactions by fluorescence correlation spectroscopy

Recently, fluorescence correlation spectroscopy was employed to analyze the binding of MARCKS 151–175 to LUVs (20). The results obtained for this peptide were comparable to those obtained from binding measurements of radioactively labeled MARCKS 151–175 using a centrifugation technique. It was also used by Takakuwa et al., who investigated the binding of protein 4.1 (molecular mass, 80 kDa) with LUVs containing PS at different percentages (19). The principle of the measurement relies on the fact that LUVs and proteins, which have significantly different sizes, will have two distinct diffusion coefficients that will give rise to two correlation times (28).

In our case, we first we measured the diffusion coefficient of ezrin-Alexa488 and of LUVs containing 0.01% of DHPE-rhodamine (Fig. 5 *A*). The diffusion coefficient of LUVs was found to be of ~3 $\mu m^2/s$ and that of ezrin of ~55 $\mu m^2/s$, i.e., ~15-fold higher. This is in agreement with the value of 4 $\mu m^2/s$ and 58 $\mu m^2/s$, respectively, for LUVs and ezrin, which can be estimated using the Stokes-Einstein equation (taking 7.5 nm for the measured ezrin diameter and 100 nm for the LUVs diameter, $\eta = 0.89$ mPa s for the viscosity of a 100 mM KCl solution at 25°C).

Following the protocol described by Rusu et al. (20), we prepared solutions containing ezrin at a fixed concentration (typically 15 nM) and increased concentration of LUVs while keeping the fraction of PIP$_2$ constant. Fig. 5 *B* shows autocorrelation curves for experiments where ezrin-Alexa488 was in LUVs solution containing increasing lipid concentration (from 10 $\mu$M to 1 mM accessible lipid). The autocorrelation curve on the left represents the case when all ezrin molecules are free. The population of bound ezrin

**TABLE 1 Dissociation constants ($K_d$) expressed in terms of accessible acidic phosphospholipid (mean of three independent experiments ± SD) and measured by three different types of assay**

| Lipid composition | Cosedimentation using WT ezrin (membrane staining) | | Cosedimentation using ezrin-Alexa488 (spectrofluorimetry) | | Fluorescence correlation spectroscopy | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $K_d$ ($\mu$M) | Increase in $K_d$ (fold) | $K_d$ ($\mu$M) | Increase in $K_d$ (fold) | $K_d$ ($\mu$M) | Increase in $K_d$ (fold) |
| 5% $PIP_2$ | 5.9 ± 0.7 | 1 | 4.0 ± 0.5 | 1 | 6.2 ± 0.8 | 1 |
| 20% PS | 47.3 ± 8.3 | 8 | 63.8 ± 10.5 | 16 | 580 ± 57 | 94 |
| 20% PS/5% $PIP_2$ | NA | – | 4.2 ± 0.4 | 1.1 | 3.3 ± 0.8 | 0.5 |

grows as the lipid concentration increases as observed by the shift of the autocorrelation functions to longer timescales. Data analysis yielded the percentage of bound ezrin from left to right, as 0%, 3%, 15%, 26%, 47%, 61%, and 99%, respectively. Fig. 6 shows the percentage of ezrin bound to either PC/5%$PIP_2$, PC/20%PS, or PC vesicles as a function of the accessible acidic lipid concentration. The curves are the least-square fits of Eq. 2 to the data. Ezrin binds more strongly to vesicles containing $PIP_2$ ($K_d = 6.2 \pm 0.8$ $\mu$M) than to those containing PS ($K_d = 580 \pm 57$ $\mu$M), i.e., ~90-fold lower and barely binds to PC LUVs. It should be noted that experiments performed at 15 and 45 nM ezrin concentration lead to similar results. In Table 1, the affinity constants deduced from these fitted data are compared to those from the cosedimentation assays. The data agree well in particular for the $K_d$ values estimated for the $PIP_2$ containing vesicles. However, the nonspecific (electrostatic) binding of ezrin to PS containing LUVs is apparently lower when measured by FCS. Indeed, it was reported that the charge and size of the vesicles may significantly affect the efficiency of the cosedimentation assays due to vesicle nonspecific aggregation (15). This may explain why the

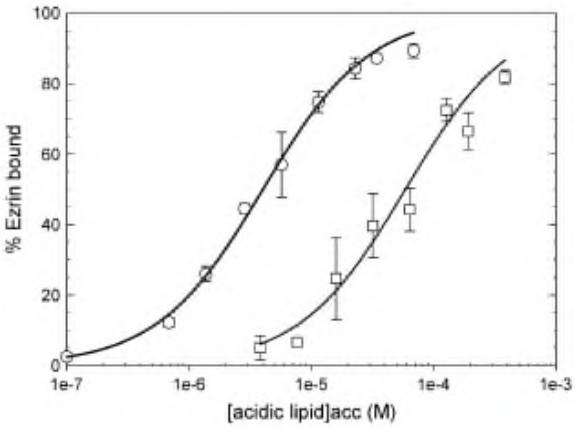



FIGURE 4 Binding of ezrin-Alexa488 to LUVs as measured by the cosedimentation assay followed by spectrofluorimetric analysis. The fluorescence of the pellet and supernatants were measured at excitation 488 nm and emission 519 nm. The percentage of ezrin bound is represented at different acidic lipid concentrations (○) (PC/PIP2, 95:5), $x$ axis is the $PIP2_{acc}$ concentration; (□) (PC/PS, 80:20), $x$ axis is the $PS_{acc}$ concentration. The curves are the least squares fits of Eq. 2 to the data, which yield the value for the molar partition coefficient $K$ (points are mean ± SD of two independent experiments). Ezrin was kept constant at 400 nM. Note the similarity with Fig. 3.

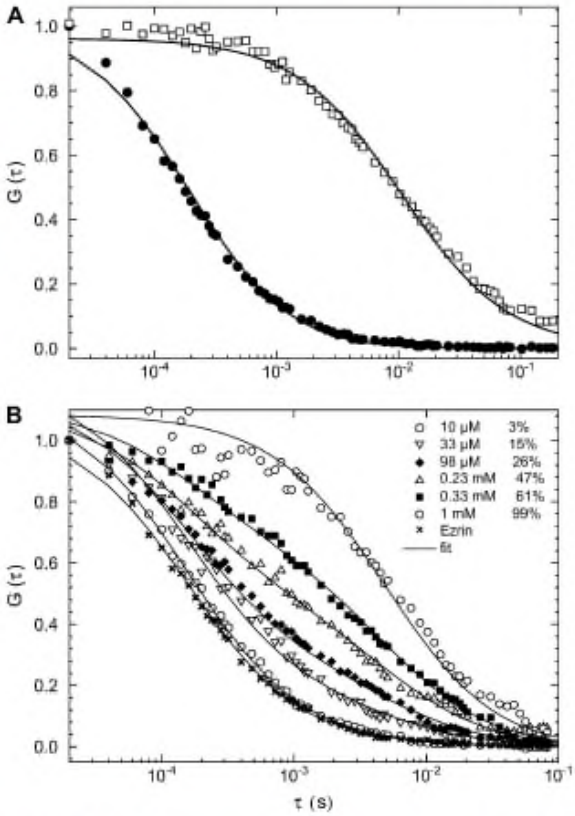



FIGURE 5 FCS measurements of ezrin, LUVs, and ezrin binding to PC/PIP2 (95:5) LUVs. (*A*) Autocorrelation curves of ezrin-Alexa488 (●) and rhodamine DHPE-labeled LUVs (□), which have a diameter of 100 nm. The diffusion coefficient was ~55 $\mu m^2/s$ for ezrin and ~3 $\mu m^2/s$ for the LUVs. (*B*) Autocorrelation curves obtained from a solution containing 15 nM ezrin-Alexa488 and different lipid concentrations are shown. Autocorrelation curves from left to right are shown for 5 $\mu$M to 1 mM accessible lipid concentrations, corresponding to 0% (×), 3% (○), 15% (▽), 26% (♦), 47% (△), 61% (■), and 99% (○) ezrin bound, respectively. The lines represent the best fit of the two-component model, Eq. 7.

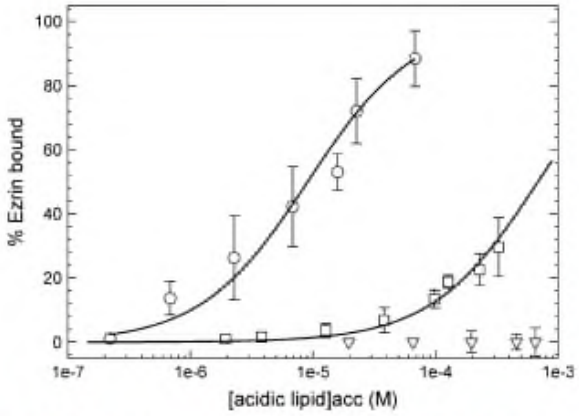



FIGURE 6 FCS measurements of ezrin binding to PC/PIP2, PC/PS, and PC LUVs (ezrin-Alexa 488 at 15 nM). The percentage of ezrin bound, deduced from data similar to those illustrated in Fig. 5 is plotted as a function of the accessible lipid concentration for (○) (PC/PIP2, 95:5), $x$ axis being the $PIP_{2acc}$ concentration; (□) (PC/PS, 80:20), $x$ axis being the $PS_{acc}$ concentration; and (▽) PC vesicles. The curves are the least squares fits of Eq. 2 to the data. Points are mean ± SD of seven measurements on each sample.

percentage of ezrin bound to PC/20% PS LUVs is systematically higher when measured by the cosedimentation assays.

## Phosphoinositide specificity of ezrin and role of PS and cholesterol in the binding

We next measured the effective dissociation constant of ezrin-A488 for LUVs containing different phosphoinositides using the quantitative cosedimentation assay and FCS to investigate the selectivity of ezrin for phosphoinositides. All the results are summarized in Table 2. The comparison of the binding of various phosphoinositides to ezrin indicates that ezrin has modest selectivity for PI(4,5)$P_2$ (Table 2). The $K_d$ is of the same order of magnitude for $PIP_2$ and PI(3,4,5)$P_3$ and is at least three- to fivefold lower for vesicles containing PI(3,4)$P_2$ or the monophosphorylated phosphoinositide PI(4)P. However, the finding that ezrin's affinity for LUVs is about the same for $PIP_2$ ($\zeta$-potential of −24.5 mV) and for the more anionic PI(3,4,5)$P_3$ ($\zeta$-potential of −30.5 mV) as compared to the similarly charged PS LUVs ($\zeta$-potential of −27.7 mV) confirms that the observed selectivity does not originate simply from nonspecific electrostatic interactions. The presence of two phosphate groups also seems to be important.

Recently, Hokanson et al. suggested that low concentrations of PS might contribute to the binding energy when myo1C is attached to the membrane via phosphoinositides (31). In another study, Gokhale et al. (32) found that Annexin 2t showed no detectable affinity for a membrane that contained 3 mol % $PIP_2$ but without cholesterol. In our case, no detectable influence of a mixture of PS/$PIP_2$ nor of cholesterol could be observed (Table 2).

## Ezrin binding to PIP$_2$ is not cooperative

An important question remains concerning the possible existence of cooperativity in the ezrin binding to the $PIP_2$ containing LUVs. The assay for probing this question differed from the previous ones in that total lipid concentration (and thus LUVs concentration) was held constant and only the mass fraction of $PIP_2$ was varied. We measured the binding of ezrin to 0.14 mM accessible total lipid composed of 0–15% $PIP_2$ while holding the total lipid concentration constant (Fig. 7). A monotonic increase can be observed in the binding curve, not a sigmoidal shape. Therefore, the hyperbolic dependence of ezrin binding on the percentage of $PIP_2$ was fitted using Eq. 2, which gave an apparent $K_d$ of 2.3 ± 0.3 $\mu$M. Also, when the data are plotted as ezrin bound versus the accessible $PIP_2$ concentration, the percentage of binding for 100 $\mu$M LUVs composed of 0–15% $PIP_2$ and for LUVs composed of 5% $PIP_2$ measured at different total lipid concentrations are similar (Fig. 7, *inset*, data for 5% $PIP_2$ are taken from Fig. 4). Therefore, the interaction of ezrin with $PIP_2$ is not cooperative, but rather has a 1:1 binding stochiometry.

**TABLE 2 Dissociation constants ($K_d$) expressed in terms of accessible acidic phosphospholipid (mean of two independent experiments ± SD) and measured by the cosedimentation assay using ezrin-Alexa488 or by fluorescence correlation spectroscopy**

| | $\zeta$-potential (mV) | $K_d$ ($\mu$M) Cosedimentation | Increase in $K_d$ (fold) | $K_d$ ($\mu$M) FCS | Increase in $K_d$ (fold) | Cellular abundance (of all PI species) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 20% PS | −27.7 ± 1.8 | 63.8 ± 10.5 | 16 | 580 ± 57 | 94 | – |
| PI(4,5)$P_2$ | −24.5 ± 0.5 | 4.0 ± 0.5 | 1 | 6.2 ± 0.8 | 1 | ~10%* |
| 5% $PIP_2$ | NA | 4.2 ± 0.4 | 1.1 | 3.3 ± 0.8 | 0.5 | |
| 20% PS/5% $PIP_2$ | NA | 4.1 ± 0.5 | 1.0 | NA | – | |
| 15% chol/5% $PIP_2$ | | | | | | |
| 5% PI(4)P | −17.6 ± 1.6 | 13.1 ± 0.6 | 3.3 | 31.5 ± 9.4 | 5.1 | ~10%* |
| 5% PI(3,4)$P_2$ | −25.6 ± 1.2 | 5.3 ± 0.7 | 1.3 | 23.5 ± 5.6 | 3.8 | <0.15% |
| 5% PI(3,4,5)$P_3$ | −30.5 ± 1.5 | 5.6 ± 0.7 | 1.4 | 9.6 ± 1.1 | 1.5 | <0.15% |

The $\zeta$-potential of the LUVs is also given; NA, not available.
*Values taken from Pendaries et al. (62).

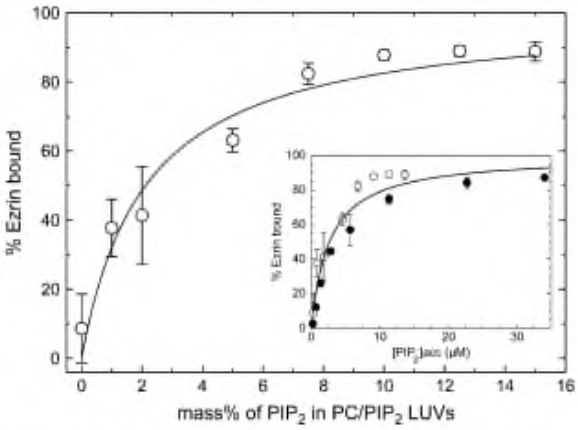



FIGURE 7 Binding of ezrin to LUVs for increasing $PIP_2$ concentrations. Binding of 400 nM ezrin-Alexa488 to 0.14 mM LUVs (accessible lipid) composed of 0–15% $PIP_2$ as measured by the cosedimentation assays followed by spectrofluorimetric analysis. The percent of ezrin bound is plotted as a function of the percentage of $PIP_2$ in the LUVs rather than total lipid concentration. Each point is the average of three experiments. The curve is the best fit with $K_d = 2.3 \pm 0.3$ $\mu$M. (*Inset*) Data in inset are represented as a function of accessible [$PIP_2$] concentration and also include the data from Fig. 4 (●). The solid line is the best fit of all the data yielding $K_d = 2.7 \pm 0.3$ $\mu$M.

## Ezrin does not induce the clustering of $PIP_2$

We then sought to investigate whether the binding of ezrin is able to cluster $PIP_2$ molecules. Experimentally, we checked whether ezrin can produce self-quenching of NBD-labeled LUVs when the fluorescent lipid is present in the vesicles at a concentration just below the level that produced self-quenching. In a first step, it is thus necessary to determine the percentage at which self-quenching begins to occur in LUVs. We found for NBD-PC LUVs that self-quenching occurs at percentage above 4% (Supplementary Fig. S2). Unfortunately, in this control experiment, NBD-$PIP_2$ could not be employed as we found that a strong quenching occurred upon disruption of the LUVs with 1% TrixonX-100. This quenching can presumably be attributed to the micelle forming capacity of $PIP_2$ (and of NBD-$PIP_2$ in solution) as already evidenced in the past (33). As a consequence, if we assume a similar behavior for NBD-$PIP_2$, even a small redistribution of $PIP_2$ in vesicles containing 4% NBD-labeled $PIP_2$ should increase self-quenching. Thus, the percentage of self-quenching of NBD-$PIP_2$ was measured for different ezrin concentrations and calculated according to Eq. 8. We found that ezrin did not induce self-quenching when it binds to the LUVs (Supplementary Fig. S2). This was confirmed using Bodipy-FL-$PIP_2$ instead of TMR-$PIP_2$. As a control experiment, we verified that MARCKS is effectively inducing the quenching of TMR-$PIP_2$ in LUVs, as already shown in previous experiments (27,34). This quenching experiment suggests that ezrin does not sequester $PIP_2$ in the membrane. When PC/1% TMR-$PIP_2$ LUVs were used (1% being the maximal fraction that does not exhibit self-quenching (27), results were qualitatively similar and no self-quenching occurred (data not shown).

## Ezrin binding may contribute to mask underlying $PIP_2$ molecules not engaged in the interaction when $PIP_2$ concentration in the LUVs is high

We next investigated the influence of ezrin concentration for a given accessible lipid concentration (thus also LUVs concentration) on the total amount of ezrin bound to LUVs containing various percentages of $PIP_2$ (Fig. 8). This kind of experiment allows one to investigate the possibility for a restricted access to $PIP_2$ targets, as one ezrin binds one $PIP_2$ molecule. Due to the anisotropic shape and large area of the FERM domain (Figs. 9 and 10), ezrin may mask other $PIP_2$ molecules that would be inaccessible. Thus, when plotted in terms of ezrin bound for different percentages of $PIP_2$ in the LUVs, this phenomenon should lead to saturation in the amount of ezrin bound. In this experiment, the accessible lipid concentration was set at a high value (0.88 mM, which is equivalent to a LUVs concentration of 14.2 nM) so that the vesicle concentration itself was not the limiting factor, but rather the percentage of $PIP_2$. The total amount of ezrin bound is represented as a function of the initial ezrin concentration, for LUVs containing either 1%, 5%, or 7.5% of $PIP_2$ (Fig. 8). The amount of ezrin bound shows a steep increase for the 1% $PIP_2$ concentration and levels off very rapidly when ezrin concentration reaches 4 $\mu$M. This indicates that all the binding sites are presumably saturated. On the other hand, the amount of ezrin bound steadily increases for LUVs composed of 5% $PIP_2$ concentration and does not reach a plateau over the range of concentrations investigated, which indicates that there are still available

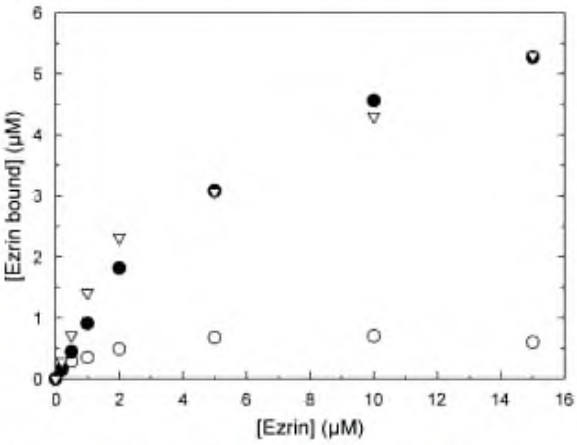



FIGURE 8 Amount of ezrin-Alexa488 bound to 0.88 mM LUVs (accessible lipid) as a function of the initial concentration of ezrin, as measured by the spectrofluorimetric cosedimentation assay for LUVs containing 1% $PIP_2$ (○), 5% $PIP_2$ (●), and 7.5% $PIP_2$ (▽).

binding sites for ezrin. The LUVs containing 7.5% of $PIP_2$ have a very similar behavior to that containing 5% of $PIP_2$. Thus, it seems that the maximal amount of ezrin bound is reached when the percentage of $PIP_2$ is ~5–7.5%. We suggest that this inaccessibility is due to the large size of ezrin FERM domain, which is "masking" $PIP_2$ molecules. The range of values obtained here are in qualitative agreement with the values obtained in Fig. 7 at lower ezrin concentration and lower LUVs concentration. To verify this hypothesis, we performed a simple calculation based on the known percentage of $PIP_2$ in the LUVs. We calculated the mean distance between two neighboring $PIP_2$ molecules ($d_{min}$) according to Eq. 9, knowing the mass % of $PIP_2$ in the spherical membrane, the surface area of $PIP_2$ molecules estimated at 1.1 $nm^2$ (33), the surface area of PC molecules estimated at 0.7 $nm^2$, and the molar mass of PC and $PIP_2$ (Fig. 9).

$$d_{min} = 2\sqrt{\frac{1.1[\%PIP_2] + 0.7(100 - \%PIP_2)}{\pi \times [\%PIP_2]}}. \quad (9)$$

It should be noted that we assumed here that $PIP_2$ molecules are not clustered in the membrane because: i), $PIP_2$ has a net negative charge estimated at −3 (30), and ii), recent experimental evidence suggests that $PIP_2$ alone does not form domains when incorporated in PC membrane (35); $d_{min}$ rapidly decreases when the percentage of $PIP_2$ increases. In Fig. 9 *B*, we present a schematic of the interaction between the FERM domain of ezrin with $PIP_2$ molecules, for PIP2 concentrations of, respectively, 2% and 7% (corresponding to $d_{min}$ ~ 7 nm and $d_{min}$ ~ 3.5 nm, respectively). For this purpose, and according to the structural predictions of Hamada (9) for radixin (radixin and ezrin have 90% identity sequence), the ezrin FERM domain was approximated to an ellipse of axes 3.1 and 6.5 nm (distances were measured with SPDB-viewer, leading to an area of ~30 $nm^2$). This schematic shows that many $PIP_2$ molecules are inaccessible when the concentration of $PIP_2$ is high. As a consequence, for high $PIP_2$ concentrations, the true accessible $PIP_2$ concentration may be much lower than the $PIP_2$ concentration initially introduced in LUVs. This is in agreement with the results of Fig. 8.

## DISCUSSION

### Comparison with affinities of other proteins for $PIP_2$

The $K_d$ value for interaction with $PIP_2$-LUVs (~5 $\mu$M) is on the same order of magnitude to that of other membrane-associated proteins such as a fragment from N-WASP (36), talin (37), higher than for the PH-homology domain in

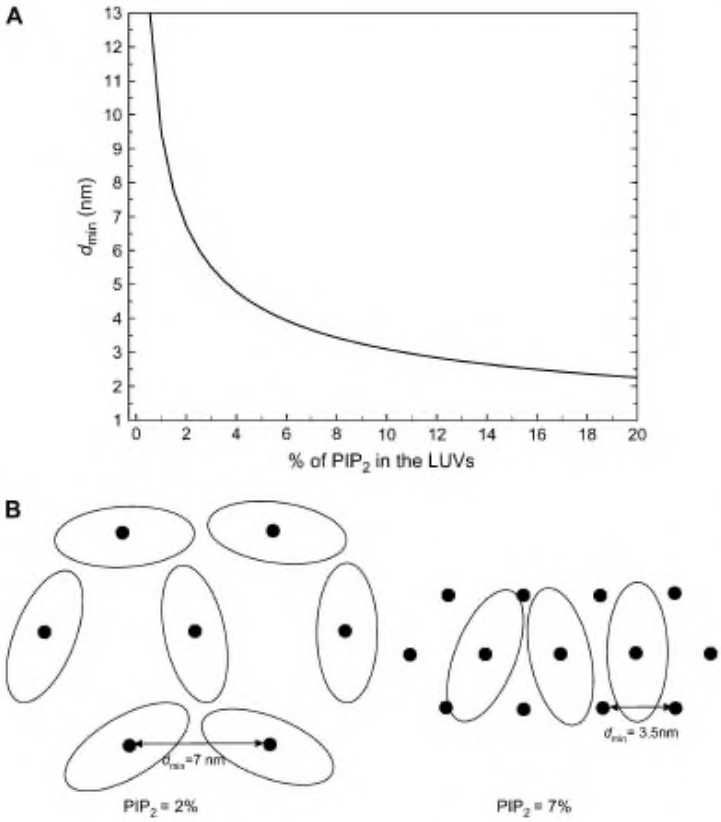



FIGURE 9 (*A*) Mean distance between two $PIP_2$ molecules ($d_{min}$) as a function of the percentage of $PIP_2$ in the LUVs. (*B*) Schematic of the interaction of the FERM domain of ezrin with $PIP_2$ molecules (represented by *black dots*), when $PIP_2$ concentration in the LUVs is set at 2% (*left*) and at 7% (*right*). (The FERM domain can be approximated to an ellipse with short and long axes of, respectively, 3.1 and 6.5 nm). This clearly shows that many $PIP_2$ molecules are inaccessible when the concentration of $PIP_2$ is high.

$\beta$-spectrin ($K_d \sim 40\ \mu M$ (38), but one order of magnitude lower than that of myosin 1c (31,39) and of annexin 2 (32). It is also two orders of magnitude lower than that of MARCKS ($K_d \sim 0.01\ \mu M$ (20)). It has to be noted that, in the case of annexin 2, $K_d$ was measured using surface plasmon resonance on LUVs adsorbed to the sensor chip. This different configuration may lead to different $K_d$ values. In our case, we found that $K_d$ estimated by surface plasmon resonance for 2% $PIP_2$-$LUV_S$ was one order of magnitude lower ($\sim 0.4\ \mu M$) than that found by spectrofluorimetry and by FCS (data not shown). In the case of surface adsorbed LUVs, it is difficult to estimate the true $PIP_2$ concentration due to the vesicles immobilization.

## Nonclustering of $PIP_2$ upon interaction with ezrin

$PIP_2$ has several important roles in vivo and it was hypothesized that it is concentrated in membrane microdomains, such as cholesterol-rich lipid rafts (40,41). Also, some in vitro studies suggest that it may exist in clusters (or is locally sequestered) when bound to proteins (32,34). According to Janmey et al. (41), three possible mechanisms could explain this clustering: i), local membrane curvature because $PIP_2$ is a micelle-forming lipid that prefers curved surfaces instead of flat membrane (33); ii), presence of hydrogen bonds between adjacent $PIP_2$ molecules and water bridging; iii), interactions with cytosolic proteins, or peripheral membrane-bound proteins or transmembrane receptors that contain a $PIP_2$ binding site (usually a basic domain).

There are now several proofs of evidence that $PIP_2$ does not by itself form domains when incorporated into model membranes. Atomic force microscopy observations on POPC supported lipid bilayers containing $PIP_2$ showed a uniform distribution of the lipids (42). Similar results were found on LUVs using fluorescence measurements on 5% NBD-$PIP_2$-containing POPC membrane (35) (they contradict another study performed by Gericke et al. (43) on LUVs but in this latter case, the acyl chain of the labeled $PIP_2$ was much shorter (C6), which may explain the poor incorporation in the lipid membrane). The situation is different when $PIP_2$ in the vesicle is interacting with proteins. Using a similar quenching assay, McLaughlin and co-workers (27,44) evidenced that the polybasic effector domain of MARCKS forms clusters of $PIP_2$ in LUVs. Recently, annexin 2t was also found to induce $PIP_2$ clustering in both LUVs (by observing a shift in the fluorescence emission of Laurdan) and GUVs (by using $PIP_2$-labeled GUVs and labeled annexin 2t) (32). It has indeed been suggested, in the case of A2t, that the lateral interaction between proteins may increase $PIP_2$ clustering. On the other hand, other proteins, like annexin 2 and the PH domain of PLC$\delta$1, were found not to cluster $PIP_2$ (32). Our data with ezrin suggest that $PIP_2$ in LUVs is not forming domains upon ezrin interaction.

The 1:1 stoichiometry of ezrin/$PIP_2$ binding presumably indicates that ezrin has only one interaction site with $PIP_2$. In fact, x-ray crystallography data on radixin and moesin show that the FERM domain is organized in a cloverleaf structure containing three lobs (F1, F2, F3) (9,45). F1 and F3 are forming a molecularly flat surface that is positively charged and contains several basic residues (Fig. 10). According to the structure of the complex inositol-(1,4,5)-trisphosphate ($IP_3$) with the radixin FERM domain, a basic cleft containing many lysine and arginine residues (Fig. 10, residues colored in *blue* and *green*), located between F1 and F3 subdomains, is responsible for a stereospecific interaction (9). At the same time, site-directed mutagenesis on ezrin allowed Barret et al. (7) to identify three pairs of lysine residues that are necessary for $PIP_2$-membrane binding (K62,K63 in subdomain F1, and K253, K254, K262, K263 in F3; Fig. 10, residues colored in *orange*). This led Balla et al. to hypothesize that there are two potential $PIP_2$ binding sites (46). However, by looking at the surface of the FERM domain (Fig. 10 *C*), we rather suggest that all the amino acids are important in the ezrin/$PIP_2$ binding and contribute to stabilize the interaction.

## Biological relevance of ezrin/phosphoinositides binding

Our results suggest that ezrin binds $PIP_2$-containing membrane with a moderate affinity ($K_d \sim 5\ \mu M$) and that this

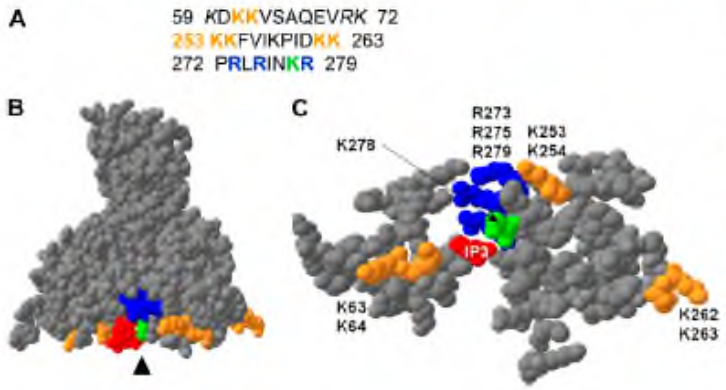



FIGURE 10 (*A*) Primary sequences of ezrin in the subdomains F1 and F3 of the FERM domain, where potential $PIP_2$ and $IP_3$ binding sites have been localized (Protein Data Bank code, 1GC6). Potential binding site in ezrin as identified by Barret et al. (7) who performed site-directed mutagenesis on three lysine pairs (K63, K64; K253, K254; K262, K263) are indicated in orange. The basic residues (K278 in *green* and R273, R275, R279 in *blue*) being part of the basic cleft, according to Hamada et al. (9) are also indicated. In italic are the arginine and lysine residues from the basic cleft but that are not on the surface of the FERM domain. (*B*) Three-dimensional visualization of the FERM domain (*lateral view*) by SPDB-Viewer 3.7. (*C*) A slab of 10 Å in the direction of the arrowhead, allowing one to visualize the molecularly flat surface of the FERM domain.

interaction is specific. Ezrin has modest selectivity for $PIP_2$ and binds equally well to $PI(3,4,5)P_3$. However, in the cell in the resting state, $PIP_2$ accounts for 99% of all the PI lipids whereas $PI(3,4,5)P_3$ has only transient localized peaks during events such as chemotaxis (47), (48), macropinocytosis (a non-clathrin-mediated endocytotic pathway (49)), or phagocytosis (50). In phagosomal membrane, PI(4)P is the most abundant phosphoinositide produced, followed by $PIP_2$, whereas $PI(3,4,5)P_3$ is detected only occasionally (51). Indeed, actin assembly on phagosomes was found to require $PIP_2$/ezrin interactions.

Events such as endocytosis and phagocytosis, if they disorganize the membrane-cytoskeleton architecture locally, do not seem to alter the general distribution of ezrin (52,53). But Araki et al. (49) suggested that proteins that can bind to both $PIP_2$ and $PI(3,4,5)P_3$ may be associated with macropinosomes longer than proteins that can bind only to $PI(4,5)P_2$. Thus, ezrin would fall in this category, although it has never directly been shown to interact with $PI(3,4,5)P_3$ in vivo. Interestingly, in epithelial cells, $PI(3,4,5)P_3$ was recently found to be localized mainly on the basolateral membrane (54), whereas ezrin is enriched at the apical surface (55). Thus, the cellular localization of ezrin may well depend on the associated proteins in addition to specific phosphoinositides.

### Ezrin/$PIP_2$ interactions in mediating cytoskeletal changes

$PIP_2$ is highly concentrated in actin-rich structures, where it regulates the activity of actin polymerization/depolymerization via gelsolin, N-WASP, or profilin (56). In fact, actin is negatively charged at pH 7.4 ($pI = 5.6$) and each actin monomer bears an excess of four negative charges (57). Thus, actin is not expected to directly bind the negatively charged $PIP_2$. On the contrary, a number of actin-binding proteins such as ERM proteins (vinculin, talin, actinin, gelsolin, or profilin) bind $PIP_2$. The final cellular effects of these proteins (actin bundling, (de)polymerization, or stabilization) and the variations in the $PIP_2$ concentration, will depend on the balance between their relative amount and their cellular localization.

$PIP_2$ is also known to regulate the adhesion energy between the cytoskeleton and the plasma membrane (58). Based on measurement of the adhesion energy between the plasma membrane and the cytoskeleton, Nebl et al. (59) suggest that there are several thousands of $PIP_2$ molecules per $\mu m^2$, each capable of binding with low affinity membrane-associated proteins. They hypothesize that large regions of eukaryotic cell surfaces are supported by either large numbers of low affinity interactions (i.e., very dynamic interactions) or by few, sparsely distributed high affinity interactions. In the first case, these interactions, although of weak affinity, would be cumulatively important and sufficient for many cellular processes.

A simple calculation allows one to estimate that, in a cell of 10 $\mu m$ in diameter, a typical $PIP_2$ concentration of 1% has an effective concentration of $\sim 15\ \mu M$ on the membrane surface (60,61), which would be sufficient to fully activate ezrin. In addition, cellular specificity of ezrin for $PIP_2$ would derive from a combination of modest $PIP_2$ selectivity (Table 2) and the relative abundance of $PIP_2$ over other phosphoinositides (62). Thus, ezrin-$PIP_2$ interaction at the inner plasma membrane may serve to concentrate ezrin at regions where other proteins that can bind ezrin will come into play. ERM proteins, which can both bind $PIP_2$ and actin, have thus an important role in the maintenance of cell shape and polarity. They were found to stabilize microvillar structures (63) and to be essential for motility and maintenance of Schwann cell polarity (64). In membrane blebs, ezrin was found to be the first protein recruited when bleb expansion ceased (10). Also, finally, chromophore assisted light inactivation (micro-CALI) experiments showed that the selective inactivation of ezrin induced an immediate reversible cell rounding demonstrating the role of ezrin in defining cell shape (65).

## CONCLUSION

Using cosedimentation assays and fluorescence correlation spectroscopy, we found that ezrin interaction with $PIP_2$-containing LUVs is specific with a $K_d$ of $\sim 5\ \mu M$, which would be sufficient for allowing binding of ezrin to $PIP_2$ in the plasma membrane in vivo. Fluorescently labeled ezrin (ezrin-Alexa488) was synthesized for the purpose of performing fluorescence spectroscopy techniques and may be used for performing subsequent microscopy studies. The interaction between ezrin and $PIP_2$ was found to be noncooperative. Finally, by varying ezrin concentration in contact with LUVs at a fixed lipid concentration, we found that ezrin FERM domain ($\sim 30\ nm^2$) binding to a single $PIP_2$ can block the access to neighboring $PIP_2$ molecules and thus contributes to lower the accessible $PIP_2$ concentration. In addition, no evidence exists for a clusterization of $PIP_2$ upon ezrin interaction.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

To view all of the supplemental files associated with this article, visit www.biophysj.org.

We thank Benoît Frisch (University of Strasbourg, Strasbourg, France) for discussions regarding ezrin labeling and Stuart McLaughlin (Stony Brook University, Stony Brook, NY) for discussions regarding the $\zeta$-potential of membranes and the quenching experiments with MARCKS. We are grateful to Michel Terray and Sandrine Vieules from Malvern Instruments for providing the Zeta NanoZS apparatus.

C.P. is a Junior Member of the Institut Universitaire de France whose support is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

1. Bretscher, A., K. Edwards, and R. G. Fehon. 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:586–599.
2. Mangeat, P., C. Roy, and M. Martin. 1999. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.* 9:187–192.

3. Tsukita, S., and S. Yonemura. 1999. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J. Biol. Chem.* 274:34507–34510.

4. Yonemura, S., and S. Tsukita. 1999. Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J. Cell Biol.* 145:1497–1509.

5. Gary, R., and A. Bretscher. 1995. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol. Biol. Cell.* 6:1061–1075.

6. Simons, P. C., S. F. Pietromonaco, D. Reczek, A. Bretscher, and L. Elias. 1998. C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253:561–565.

7. Barret, C., C. Roy, P. Montcourrier, P. Mangeat, and V. Niggli. 2000. Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J. Cell Biol.* 151:1067–1080.

8. Niggli, V., C. Andreoli, C. Roy, and P. Mangeat. 1995. Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Lett.* 376:172–176.

9. Hamada, K., T. Shimizu, T. Matsui, S. Tsukita, and T. Hakoshima. 2000. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J.* 19:4449–4462.

10. Charras, G. T., C. K. Hu, M. Coughlin, and T. J. Mitchison. 2006. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J. Cell Biol.* 175:477–490.

11. Takeda, S., A. Saitoh, M. Furuta, N. Satomi, A. Ishino, G. Nishida, H. Sudo, H. Hotani, and K. Takiguchi. 2006. Opening of holes in liposomal membranes is induced by proteins possessing the FERM domain. *J. Mol. Biol.* 362:403–413.

12. Payrastre, B., K. Missy, S. Giuriato, S. Bodin, M. Plantavid, and M. Gratacap. 2001. Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *Cell. Signal.* 13:377–387.

13. Fievet, B. T., A. Gautreau, C. Roy, L. Del Maestro, P. Mangeat, D. Louvard, and M. Arpin. 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J. Cell Biol.* 164:653–659.

14. Niggli, V. 2005. Regulation of protein activities by phosphoinositide phosphates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:57–79.

15. Cho, W., L. Bittova, and R. V. Stahelin. 2001. Membrane binding assays for peripheral proteins. *Anal. Biochem.* 296:153–161.

16. Rebecchi, M., A. Peterson, and S. McLaughlin. 1992. Phosphoinositide-specific phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phospholipid vesicles containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry.* 31:12742–12747.

17. Buser, C. A., and S. McLaughlin. 1998. Ultracentrifugation technique for measuring the binding of peptides and proteins to sucrose-loaded phospholipid vesicles. *Methods Mol. Biol.* 84:267–281.

18. Stahelin, R. V., and W. Cho. 2001. Differential roles of ionic, aliphatic, and aromatic residues in membrane-protein interactions: a surface plasmon resonance study on phospholipases A2. *Biochemistry.* 40:4672–4678.

19. Takakuwa, Y., C. G. Pack, X. L. An, S. Manno, E. Ito, and M. Kinjo. 1999. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of the hydrophobic interactions of protein 4.1 with phosphatidyl serine liposomes. *Biophys. Chem.* 82:149–155.

20. Rusu, L., A. Gambhir, S. McLaughlin, and J. Radler. 2004. Fluorescence correlation spectroscopy studies of peptide and protein binding to phospholipid vesicles. *Biophys. J.* 87:1044–1053.

21. Roy, C., M. Martin, and P. Mangeat. 1997. A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding. *J. Biol. Chem.* 272:20088–20095.

22. Hope, M. J., M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis. 1985. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure: characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta.* 812:55–65.

23. Hunter, R. J. 1981. Zeta Potential in Colloid Science. Academic Press, New York.

24. Cantor, C. R., and P. R. Schimmel. 1998. Biophysical Chemistry. Freeman, Oxford, UK.

25. Ha, T., I. Rasnik, W. Cheng, H. P. Babcock, G. H. Gauss, T. M. Lohman, and S. Chu. 2002. Initiation and re-initiation of DNA unwinding by the Escherichia coli Rep helicase. *Nature.* 419:638–641.

26. Schwille, P., and E. Haustein. 2002. Fluorescence correlation spectroscopy: a tutorial for the Biophysics Textbook Online (BTOL). http://www.biophysics.org/btol/index.html. [Online].

27. Gambhir, A., G. Hangyas-Mihalyne, I. Zaitseva, D. S. Cafiso, J. Wang, D. Murray, S. N. Pentyala, S. O. Smith, and S. McLaughlin. 2004. Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys. J.* 86:2188–2207.

28. Elson, E. L. 2001. Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells. *Traffic.* 2:789–796.

29. McLaughlin, S. 1989. The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18:113–136.

30. Toner, M., G. Vaio, A. McLaughlin, and S. McLaughlin. 1988. Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry.* 27:7435–7443.

31. Hokanson, D. E., J. M. Laakso, T. Lin, D. Sept, and E. M. Ostap. 2006. Myo1c binds phosphoinositides through a putative pleckstrin homology domain. *Mol. Biol. Cell.* 17:4856–4865.

32. Gokhale, N. A., A. Abraham, M. A. Digman, E. Gratton, and W. Cho. 2005. Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J. Biol. Chem.* 280:42831–42840.

33. Sugiura, Y. 1981. Structure of molecular aggregates of 1-(3-sn-phosphatidyl)-L-myo-inositol 3,4-bis(phosphate) in water. *Biochim. Biophys. Acta.* 641:148–159.

34. Golebiewska, U., A. Gambhir, G. Hangyas-Mihalyne, I. Zaitseva, J. Radler, and S. McLaughlin. 2006. Membrane-bound basic peptides sequester multivalent (PIP2), but not monovalent (PS), acidic lipids. *Biophys. J.* 91:588–599.

35. Fernandes, F., L. M. Loura, A. Fedorov, and M. Prieto. 2006. Absence of clustering of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in fluid phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* 47:1521–1525.

36. Papayannopoulos, V., C. Co, K. E. Prehoda, S. Snapper, J. Taunton, and W. A. Lim. 2005. A polybasic motif allows N-WASP to act as a sensor of PIP(2) density. *Mol. Cell.* 17:181–191.

37. Seelig, A., X. L. Blatter, A. Frentzel, and G. Isenberg. 2000. Phospholipid binding of synthetic talin peptides provides evidence for an intrinsic membrane anchor of talin. *J. Biol. Chem.* 275:17954–17961.

38. Hyvonen, M., M. J. Macias, M. Nilges, H. Oschkinat, M. Saraste, and M. Wilmanns. 1995. Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J.* 14:4676–4685.

39. Hokanson, D. E., and E. M. Ostap. 2006. Myo1c binds tightly and specifically to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:3118–3123.

40. Kwik, J., S. Boyle, D. Fooksman, L. Margolis, M. P. Sheetz, and M. Edidin. 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:13964–13969.

41. Janmey, P. A., and U. Lindberg. 2004. Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:658–666.

42. Herrig, A., M. Janke, J. Austermann, V. Gerke, A. Janshoff, and C. Steinem. 2006. Cooperative adsorption of ezrin on PIP2-containing membranes. *Biochemistry.* 45:13025–13034.

43. Redfern, D. A., and A. Gericke. 2005. pH-Dependent domain formation in phosphatidylinositol polyphosphate/phosphatidylcholine mixed vesicles. *J. Lipid Res.* 46:504–515.

44. Wang, L., M. Schönhoff, and H. Helmuth Möhwald. 2002. Lipids coupled to polyelectrolyte multilayers: ultraslow diffusion and the dynamics of electrostatic interactions. *J. Phys. Chem.* 106:9135–9142.

45. Pearson, M. A., D. Reczek, A. Bretscher, and P. A. Karplus. 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell*. 101:259–270.

46. Balla, T. 2005. Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions. *J. Cell Sci.* 118:2093–2104.

47. Franca-Koh, J., Y. Kamimura, and P. N. Devreotes. 2007. Leading-edge research: PtdIns(3,4,5)P3 and directed migration. *Nat. Cell Biol.* 9:15–17.

48. Huang, Y. E., M. Iijima, C. A. Parent, S. Funamoto, R. A. Firtel, and P. Devreotes. 2003. Receptor-mediated regulation of PI3Ks confines PI(3,4,5)P3 to the leading edge of chemotaxing cells. *Mol. Biol. Cell.* 14:1913–1922.

49. Araki, N., Y. Egami, Y. Watanabe, and T. Hatae. 2007. Phosphoinositide metabolism during membrane ruffling and macropinosome formation in EGF-stimulated A431 cells. *Exp. Cell Res.* 313:1496–1507.

50. Dewitt, S., W. Tian, and M. B. Hallett. 2006. Localised PtdIns(3,4,5)P3 or PtdIns(3,4)P2 at the phagocytic cup is required for both phagosome closure and $Ca^{2+}$ signalling in HL60 neutrophils. *J. Cell Sci.* 119:443–451.

51. Defacque, H., E. Bos, B. Garvalov, C. Barret, C. Roy, P. Mangeat, H. W. Shin, V. Rybin, and G. Griffiths. 2002. Phosphoinositides regulate membrane-dependent actin assembly by latex bead phagosomes. *Mol. Biol. Cell.* 13:1190–1202.

52. Diakonova, M., G. Bokoch, and J. A. Swanson. 2002. Dynamics of cytoskeletal proteins during Fcgamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *Mol. Biol. Cell.* 13:402–411.

53. Erwig, L. P., K. A. McPhilips, M. W. Wynes, A. Ivetic, A. J. Ridley, and P. M. Henson. 2006. Differential regulation of phagosome maturation in macrophages and dendritic cells mediated by Rho GTPases and ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:12825–12830.

54. Gassama-Diagne, A., W. Yu, M. ter Beest, F. Martin-Belmonte, A. Kierbel, J. Engel, and K. Mostov. 2006. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 8:963–970.

55. Miller, K. G. 2003. A role for moesin in polarity. *Trends Cell Biol.* 13:165–168.

56. Yin, H. L., and P. A. Janmey. 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* 65:761–789.

57. Deme, B., D. Hess, M. Tristl, L. Lee, and E. Sackmann. 2000. Binding of actin filaments to charged lipid monolayers: film balance experiments combined with neutron reflectivity. *Eur. Phys. J.* 2:125–136.

58. Raucher, D., and M. P. Sheetz. 2000. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J. Cell Biol.* 148:127–136.

59. Nebl, T., S. W. Oh, and E. J. Luna. 2000. Membrane cytoskeleton: PIP(2) pulls the strings. *Curr. Biol.* 10:R351–R354.

60. McLaughlin, S., J. Wang, A. Gambhir, and D. Murray. 2002. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:151–175.

61. Liu, A. P., and D. A. Fletcher. 2006. Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. *Biophys. J.* 91:4064–4070.

62. Pendaries, C., H. Tronchere, M. Plantavid, and B. Payrastre. 2003. Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Lett.* 546:25–31.

63. Brown, M. J., R. Nijhara, J. A. Hallam, M. Gignac, K. M. Yamada, S. L. Erlandsen, J. Delon, M. Kruhlak, and S. Shaw. 2003. Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood.* 102:3890–3899.

64. Gatto, C. L., B. J. Walker, and S. Lambert. 2007. Asymmetric ERM activation at the Schwann cell process tip is required in axon-associated motility. *J. Cell. Physiol.* 210:122–132.

65. Lamb, R. F., B. W. Ozanne, C. Roy, L. McGarry, C. Stipp, P. Mangeat, and D. G. Jay. 1997. Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr. Biol.* 7:682–688.

# Article 2 – Biophysical Journal 2008

4348 Biophysical Journal Volume 95 November 2008 4348–4360

## Giant Unilamellar Vesicles Containing Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate: Characterization and Functionality

Kévin Carvalho,*† Laurence Ramos,† Christian Roy,* and Catherine Picart*
*DIMNP, Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5235, Université Montpellier II et I, Montpellier, France; and †Laboratoire des Colloïdes, Verres et Nanomatériaux, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5587, Université Montpellier II, Montpellier Cedex 5, France

ABSTRACT Biomimetic systems such as giant unilamellar vesicles (GUVs) are increasingly used for studying protein/lipid interactions due to their size (similar to that of cells) and to their ease of observation by light microscopy techniques. Biophysicists have begun to complexify GUVs to investigate lipid/protein interactions. In particular, composite GUVs have been designed that incorporate lipids that play important physiological roles in cellulo, such as phosphoinositides and among those the most abundant one, phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate ($PIP_2$). Fluorescent lipids are often used as tracers to observe GUV membranes by microscopy but they can not bring quantitative information about the insertion of unlabeled lipids. In this study, we carried out $\zeta$-potential measurements to prove the effective incorporation of $PIP_2$ as well as that of phosphatidylserine in the membrane of GUVs prepared by electroformation and to follow the stability of $PIP_2$-containing GUVs. Using confocal microscopy, we found that long-chain (C16) fluorescent $PIP_2$ analogs used as tracers (0.1% of total lipids) show a uniform distribution in the membrane whereas $PIP_2$ antibodies show $PIP_2$ clustering. However, the clustering effect, which is emphasized when tertiary antibodies are used in addition to secondary ones to enhance the size of the detection complex, is artifactual. We showed that divalent ions ($Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$) can induce aggregation of $PIP_2$ in the membrane depending on their concentration. Finally, the interaction of ezrin with $PIP_2$-containing GUVs was investigated. Using either labeled ezrin and unlabeled GUVs or both labeled ezrin and GUVs, we showed that clusters of $PIP_2$ and proteins are formed.

### INTRODUCTION

Phosphoinositides are a particular class of lipids present in cell membranes that have very important physiological roles (1). Their structure shares a common inositol ring bearing one, two, or three phosphate groups and their glycerol moieties link both a saturated and an unsaturated alkyl chain. Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate (PI(4,5)$P_2$ or $PIP_2$) is the most abundant phosphoinositide at the plasma membrane. It has the ability to interact with a wide range of proteins (2–4). It is now well documented that $PIP_2$ regulates the cytoskeleton/plasma membrane interactions, membrane trafficking, exocytosis, endocytosis, and the activation of enzymes (2,5–7). A great deal of work is dedicated to the understanding of the role of $PIP_2$ in cellulo, using fluorescent tools (8). In addition, studies in biomimetic systems, including large unilamellar vesicles (LUVs) (9,10), supported lipid bilayers (SLBs) (11,12), and giant unilamellar vesicles (GUVs) (13,14) have emerged during the past years to elucidate the molecular mechanisms of protein/lipid interactions in well defined systems composed of a limited number of constituents. Thus, LUVs allow one to carry out quantitative determination of affinity constants by co-sedimentation assays (15) or fluorescence correlation spectroscopy (16). In addition, SLBs can be observed by atomic force microscope, allowing one to follow in situ protein/membrane interactions (12) or to visualize lipid domain formation (17). Nevertheless, GUVs are more "cell mimics" than LUVs and SLBs as their size (from ~5 to ~40 $\mu$m) and membrane curvature are similar to those of cells and as they can be observed using a light microscope (18,19). The protocol for producing LUVs seems rather well established (15) and various phosphoinositides have already been incorporated in LUVs (14). Their characterization is possible by means of electrophoretic (i.e., $\zeta$-potential) measurements to check whether $PIP_2$ is effectively incorporated in the LUVs. $\zeta$-Potential measurements also allow investigations of ion/vesicles (20) or protein/vesicles interactions (21). Recently, electrophoretic measurements also were used for measuring the $\zeta$-potential of LUVs fabricated from a lipid mixture that contains various amounts of phosphoinositides (22).

Very generally, the preparation of GUVs is recognized to be much less straightforward than that of LUVs. Two main methods for preparing GUVs are widely used: the gentle hydration method (23) and electroformation (24). The former, although much simpler, is known to give a poor yield in unilamellar vesicles and a high percent of vesicles presenting defects, but it can be used in physiological media (media of relatively high ionic strength) (25). The latter gives a high yield of unilamellar vesicles but is restricted to low ionic strength media due to the application of an electric field (25). Furthermore, it has also been shown that the presence of a too large fraction of negatively charged lipids does not favor the

*Submitted November 30, 2007, and accepted for publication May 1, 2008.*
Address reprint requests to Catherine Picart, E-mail: catherine.picart@univ-montp2.fr.
Editor: Enrico Gratton.
© 2008 by the Biophysical Society
0006-3495/08/11/4348/13 $2.00

doi: 10.1529/biophysj.107.126912

formation of unilamellar vesicles with both methods. In addition, the size of the GUVs renders them more fragile and more difficult to manipulate than LUVs. A survey of the literature indicates that studies on GUVs containing phosphoinositides are only emerging (Table 1). The gentle hydration method has been mostly chosen to prepare $PIP_2$-containing GUVs (26–28) and only three recent studies used electroformation (13,14,29) with unlabeled $PIP_2$ and a small percent of labeled dipyrromethene boron difluoride (BODIPY) tetramethylrhodamine $PIP_2$ (TMR-$PIP_2$) or BODIPY FL $PIP_2$ (FL-$PIP_2$). However, $PIP_2$ is known to be a micelle-forming lipid (29,30) due to its large polar headgroup, and short chains TMR-$PIP_2$ and FL-$PIP_2$ are also known to not partition easily into a phosphatidylcholine membrane (29). Thus, it seems important to check, on the one hand, that $PIP_2$ is effectively incorporated in the membrane of GUVs and, on the other hand, whether fluorescent $PIP_2$ molecules and $PIP_2$ antibodies are reliable indicators of the incorporation of native $PIP_2$ within vesicles.

In this work, our aim was to investigate the conditions for the effective formation of GUVs containing $PIP_2$ by electroformation to subsequently use these GUVs for investigating protein/membrane interactions. As fluorescent lipids are useful and often needed to carry out confocal microscopy observations, we will also investigate the conditions for incorporation of FL-$PIP_2$ and TMR-$PIP_2$ as tracers in GUVs. $\zeta$-Potential measurements on GUVs, direct incorporation of fluorescently labeled $PIP_2$, and antibody-labeling of GUVs will prove that $PIP_2$ is effectively and quantitatively incorporated in the membrane of GUVs.

Finally, we will show that ezrin, a protein that is known to interact via its FERM (4.1, ezrin, radixin, moesin) domain with $PIP_2$ molecules inserted in supported lipid bilayers (12) and with large unilamellar vesicles containing $PIP_2$ (22), is able to induced $PIP_2$ reorganization on interaction with the membrane of GUVs.

## MATERIALS AND METHODS

### Lipids and buffers

1,2-Dioleoly-*sn*,-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylserine (POPS) were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Cholesterol (Chol) was obtained from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). The ammonium salt of L-α-phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate ($PIP_2$) was purchased from Lipid Products (Surrey, Great Britain). The $PIP_2$ is extracted from natural source and thus contains both unsaturated and saturated acyl chains. BODIPY-TMR-PI(4,5)$P_2$ (TMR-$PIP_2$, reference C-45M16a for the C16 chain and reference C45-M6a for the C6 one), BODIPY-FL-PI(4,5)$P_2$ (FL-$PIP_2$, reference C-45F16a for the C16 chain and reference C-45F6a for the C6 one) were purchased from Echelon Bioscience (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). These BODIPY-$PIP_2$ are fluorescent analogs of $PIP_2$ and contain only saturated alkyl chains with the dye grafted at one of the alkyl chains (the structures are available at http://www.echelon-inc.com). Monoclonal antibodies ($IgG_{2B}$) against $PIP_2$ were bought from Assay Designs (Ann Arbor, MI). Secondary and tertiary antibodies (rabbit anti-mouse coupled to Alexa 568 (RAM-Alexa 568), unlabeled goat anti-mouse antibody (GAM), and donkey anti-goat antibody coupled to Alexa488 (DAG-Alexa488) were bought from Molecular Probes (Eugene, OR).

Ezrin was kept at 4°C in a buffer containing 70 mM NaCl, 25 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) at pH 6.2 (MES-NaCl buffer). For experiments with GUVs, the buffer was brought to pH 7.4 with 30 mM Tris (Ezrin buffer). Vesicles were prepared in a buffer containing sucrose (165 mM sucrose, 2 mM Tris, 0.5 mM EGTA, pH = 7.4, sucrose buffer) and were resuspended in a glucose buffer (170 mM glucose, 2 mM Tris, 0.5 mM EGTA, pH = 7.4, glucose buffer). The osmolarities of the buffers were checked using an osmometer (Vapro, Wescor, Logan, UT). We measured the following osmolarities: (173 ± 3) mOsm for the sucrose buffer, (180 ± 3) mOsm for the glucose buffer, and (184 ± 3) mOsm for the ezrin buffer.

### Protein expression, purification, and labeling

The expression and purification of wild-type (WT) ezrin cloned in the pGEX 2-T vector have already been described (31). Recently, we produced ezrin with an additional cysteine at its C terminus following two extra glycine residues (GGC) to covalently couple it to a maleimide fluorophore (22). Both wild-type ezrin and ezrin-cysteine were obtained using the same purification procedure. Labeling of ezrin-cysteine was carried out using either Alexa488-C5-maleimide (Alexa488) or Alexa546-C5 maleimide (Alexa546), both from Molecular Probes. Purified ezrin conserved in the MES-NaCl buffer

**TABLE 1 Summary of the studies investigating protein interactions with $PIP_2$-containing GUVs prepared by the gentle hydration method or by electroformation**

| Study | GUVs preparation | Composition | Suspending medium | Proteins |
|---|---|---|---|---|
| Gentle hydration | | | | |
| Takeda et al. (27) | 25°C in 5 mM Tris-HCl | PC/PE/PG/$PIP_2$ | KCl buffer (0–120 mM) | Talin |
| Tong et al. (51) | 37°C in 100 mM sucrose | DOPC/DOPG/SM/Chol/$PIP_2$/TMR-$PIP_2$ | 100 mM glucose | GAP-43 |
| Golebiewska et al. (28) | 35–40°C in 100 mM KCl | POPC/PS/$PIP_2$ | 100 mM KCl | MARCKS (151-175)-Alexa488 |
| Heuvingh et al. (45) | in 280 mM sucrose | DOPC/$PIP_2$ | HeLa cell extracts | ARF1, Actin |
| Electroformation | | | | |
| Liu and Fletcher (13) | 60°C in 350 mOsm sucrose | DOPC/DPPC/Chol/TMR-$PIP_2$/$PIP_2$ | 50 mM KCl | N-WASP, Arp2/3, Actin |
| Gokhale et al. (14) | 60°C in deionized water | POPC/POPE/POPS/$PIP_2$ | 160 mM NaCl | Annexin 2 |
| Moens et al. (29) | 45°C in 200 mM sucrose | POPC/$PIP_2$/TMR-$PIP_2$ (or FL-$PIP_2$, both C6) | 200 mM glucose | Profilin |

PC, phosphatidylcholine; POPC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; POPE, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; DOPG, dipalmitoylphosphatidylglycerol; SM, sphingomyelin; PS, phosphatidylserine; POPS, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylserine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine.
All experiments were carried out at physiological pH (7–7.4).

was treated with a 10-fold molar excess of Alexa488-C5-maleimide or Alexa546-C5 maleimide (dissolved in DMSO) for 90 min at room temperature in MES-NaCl buffer. The labeling reaction was subsequently quenched by adding an excess amount of dithiothreitol and the labeled protein was separated from the reagents using a Sephadex G25 column (GE Healthcare, Velizy, France) eluted with the MES-NaCl buffer. The labeling efficiency of ezrin was estimated by determining the respective molar concentration of dye and of protein and calculating the grafting ratio (molar extinction coefficients are respectively: $\varepsilon = 72{,}000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ for Alexa488 at 495 nm, $\varepsilon = 104{,}000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ for Alexa546 at 544 nm, $\varepsilon = 69{,}000\ M^{-1}\ cm^{-1}$ for ezrin at 280 nm). Under our labeling conditions, ~0.93 mol of Alexa488 and ~0.92 mol of Alexa546 were incorporated per mol of ezrin.

## GUVs and LUVs

GUVs were prepared using the electroformation method first described by Angelova et al. (32). The vesicles were formed using DOPC or DOPC and cholesterol (15%), with various amounts of $PIP_2$ (from 1% to 10% in weight). Briefly, 20 $\mu$L of lipid mixture at 2.5 mg/mL in chloroform/methanol 2:1 (v/v) were spread on two ITO-coated plates and quickly dried under nitrogen flow. The slides were placed under vacuum for 2 h to remove traces of organic solvent. After solvent evaporation, an electroformation chamber was formed using the ITO plates (their conductive sides facing each other), a rubber ring, and Vitrex paste to seal the chamber. The chamber was filled with ~1.5 mL of sucrose buffer and placed in an incubator at 38°C. A function generator was used to apply an AC voltage at 10 Hz, the voltage being progressively increased from 200 mV to 1 V within 30 min and kept constant for the remaining 45 min. Vesicle detachment was then achieved by decreasing the frequency to 5 Hz for 15 min. GUVs were stored at room temperature.

LUVs were prepared as described previously (22). Briefly, the appropriate lipid mixture was dried in a Speedvac rotary evaporator overnight, and the lipids were rehydrated in the sucrose buffer for 2 h at 37°C (interrupted by rigorous vortexing every 15 min), then extruding the multilamellar vesicles through a stack of two polycarbonate filters (100 nm pore size diameter) using the mini-extruder from Avanti Polar Lipids. Final concentrations of lipids were measured using the Phospholipid B kit (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) and were within 90–95% of the expected concentration. LUVs were stored at room temperature at 10 mg/mL lipid concentration.

## Light and confocal microscopy observations

For microscopy observations, GUVs were let to sediment in a glucose buffer with a weakly higher osmolarity than the sucrose buffer such as to slightly deflate the GUVs and render them more flaccid and fluctuating. The observation chambers were pegylated to prevent attractive interactions between GUVs and the glass substrate (22). A silicone insulator (P24742, Molecular Probes) glued to the pegylated glass slides was used to prepare several wells, which were filled with 15 $\mu$L of sample. Experiments with the $PIP_2$ antibodies were carried out in the ezrin buffer. For the experiments with the protein, GUVs were diluted 1:10 in the ezrin solution. Ezrin total concentration was in the range 14–22 $\mu$M. Confocal microscopy observation of GUVs were carried out on a spinning disk rapid confocal imager Ultra view ERS (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) with a 63× oil objective (NA = 1.4).

## Image analysis

Fluorescent images were analyzed with ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij/). Image superposition was realized by using the «rgb merge» function of Image J. Using the plug-in «Radial Profile plot», the integrated intensities along concentric circles (centered at the center of the GUVs) were measured. For experiments with nonfluorescent GUVs immersed in an ezrin solution containing fluorescently labeled ezrin, the integrated intensity $I$ was normalized such that the resulting intensity, $I_{NORM}$, was equal to 0 in the interior of the GUV (where the measured intensity $I_{INT}$ was the noise signal) and equal to 1 in the external medium ($I_{EXT}$, where the measured intensity is the background intensity of the ezrin medium). Hence, the normalized intensities were calculated following $I_{NORM} = (I - I_{INT})/(I_{EXT} - I_{INT})$.

To quantify the heterogeneous nature of the membrane of GUVs, we adapted a recently published procedure (33). The principle is that the formation of clusters leads to an increased occurence of areas with high (cluster) and low (intercluster) fluorescence intensities. Therefore, cluster formation results in increased SD of the fluorescence signal. The plug-in «Oval Profile Plot» was used to extract an azimuthal profile of the equatorial section of a GUV (along all the GUV contour length, i.e., for 360°). The profiles along the membrane contour were obtained by measuring over a circular region 5 pixels thick, to reduce the noise. The mean fluorescence intensity along the GUV contour was deduced ($I_{MEAN}$) as well as its SD ($\sigma$). To compare different GUVs, the ratio, $\sigma/I_{MEAN}$, is given and expressed in percentage. Thus, for one experimental condition, this ratio calculated over several GUVs quantifies the heterogeneity of the membrane. The lowest it is, the more homogeneous is on average the membrane of GUVs obtained in a given experimental condition. The lowest ratio was measured to be $\sigma/I_{MEAN} = (8.7 \pm 1.1)$ % (see Fig. 4 *A*) and thus, clusters were defined as areas of membrane with intensities 15% higher than $I_{MEAN}$.

## $\zeta$-Potential measurements

The average $\zeta$ potential of the vesicles was measured on a Malvern Zeta Sizer NanoZS (Malvern, Worcestershire, United Kingdom). The electrophoretic mobility of GUVs (respectively LUVs) was measured at 0.05 mg/mL lipid concentration (respectively 0.1 mg/mL) in the sucrose buffer and the $\zeta$-potential, $\xi$, of a vesicle, which is the electrostatic potential at the shear plane, was calculated using the Helmholtz-Smoluchowski equation (34), $\xi = (u\eta/\varepsilon_R\varepsilon_0)$, where $u$ is the velocity of the vesicle in a unit electric field (between 50 and 150 $V.cm^{-1}$ for this configuration); $\eta$ is the viscosity of the aqueous solution; $\varepsilon_R$ is the dielectric constant of the aqueous solution; and $\varepsilon_0$ is the permittivity of free space. The $\zeta$-potential is proportional to the surface charge density (34). Numerical results are given as (mean ± SD). For each measurement, 750 $\mu$L of the GUV suspension were introduced in the measurement cell. Three measurements were carried out for each sample from at least two independent preparations. In fact, the SD on each measurement, as given by the apparatus, were ~12% for GUVs and range from ~18% to ~100% for LUVs (higher SD when the potential was close to 0) and were higher than the reproducibility of the measurement, which is of the order of 5% (for a given sample as well as for independent samples). Thus we plot as error bars in the graph the SD for each measurement. The maximum size of the vesicles that can be measured is ~10 $\mu$m. To avoid sedimentation of the GUVs, $\zeta$-Potential measurements were carried out with GUVs suspended in the sucrose buffer. For the sake of comparison, the same buffer was chosen for the measurements on LUVs.

# RESULTS

## $\zeta$-Potential of GUVs

In a first step, we investigated the insertion of $PIP_2$ in membranes composed uniquely of DOPC or composed of a mixture of DOPC and cholesterol (weight fraction, 15%), as cholesterol has been reported to strengthen membranes (35,36), and consequently to increase the stability and integrity of liposomes (37). GUVs were thus electroformed with increasing percentages of $PIP_2$ in the initial lipid mixture, in the presence or in the absence of cholesterol. The $\zeta$-potential measurements were carried out within 2 h after GUVs preparation (time T0) or 24 h after their preparation. Fig. 1, *A* and *B* show the $\zeta$-potential for DOPC and DOPC/Chol GUVs, with various amounts of $PIP_2$. For DOPC/$PIP_2$

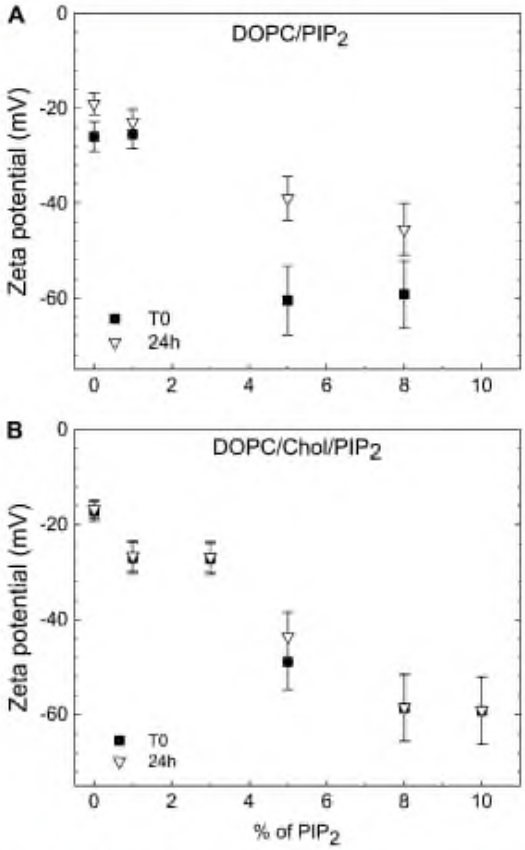



FIGURE 1 $\zeta$-Potential of giant unilamellar vesicles (GUVs) as a function of the mass percentage of $PIP_2$ incorporated in the initial lipid mixture. The electrophoretic mobility of GUVs composed of either DOPC/$PIP_2$ (*A*) or DOPC/Chol/$PIP_2$ (*B*) was measured and the $\zeta$-potential was calculated as explained in the text, after the preparation of the GUVs (time T0) or 24 h after their preparation. Values are (mean ± SD) of the measurement.

GUVs, we observe that the initial $\zeta$-potential decreases as the percentage of $PIP_2$ increases but reaches a plateau at ~5% in $PIP_2$ (Fig. 1 *A*). We find, however, noticeable differences between the values measured within 2 h after GUVs electroformation (T0) and 24 h later, indicating that the DOPC/$PIP_2$ GUVs may evolve during the storage period. In fact, the $\zeta$-potential of GUVs tends to rise with time as if $PIP_2$ was leaking from the GUV membrane. For DOPC/Chol/$PIP_2$ GUVs, similarly to the GUVs without cholesterol, the $\zeta$-potential decreased steadily when $PIP_2$ concentration is increased (Fig. 1 *B*), which suggests that more and more $PIP_2$ molecules are effectively incorporated in the membrane of GUVs. A plateau in $\zeta$-potential is reached for $PIP_2$ percentages higher than 8%. Interestingly, and in sharp contrast to the GUVs without cholesterol, the GUVs containing cholesterol seem to be stable over a duration of 24 h as their $\zeta$-potentials remain almost identical after 1 day in the storage buffer (sucrose buffer). We also noticed that repeated measurements on GUVs made from a lipid mixture containing 15% of cholesterol and 10% $PIP_2$ lead to an increase in the potential after five measurements have been carried out, which suggests that GUVs containing high amounts of $PIP_2$ are more fragile and might be more easily electroporated (38). This effect was not observed when the $PIP_2$ weight fraction of the initial lipid mixture was decreased to 5%.

Thus, in the following, the total $PIP_2$ percentage was fixed at 5% as the GUVs were stable in these conditions (no evolution of the $\zeta$-potential over repeated measurements).

## Comparison of $PIP_2$-containing GUVs with $PIP_2$-containing LUVs and with POPS-containing GUVs

As LUVs have been most often used as biomimetic systems to investigate $PIP_2$/protein interactions (10,14,15), we compared the $\zeta$-potential of GUVs made by electroformation to that of LUVs made by a rehydration method followed by extrusion through a calibrated porous membrane, for the same initial lipid compositions (Fig. 2 *A*). One finds that the $\zeta$-potential, $\xi$, of GUVs and of LUVs follows the same trend: $\xi$ decreases steadily on increase of the mass percent of $PIP_2$ in the initial lipid mixture. The $\zeta$-potential of LUVs is related linearly to that of GUVs with a slope of 0.86 (Fig. 2 *B*). Thus, GUVs and LUVs can be considered to be similar in terms of $PIP_2$ insertion. However, the potentials of GUVs is systematically found lower than that of LUVs. We note that this difference is observed even in the absence of $PIP_2$. Indeed we measured $\xi \sim (-17.2 \pm 2.0)$ mV for DOPC/Chol GUVs and $\xi \sim (-6.9 \pm 6.3)$ mV for DOPC/Chol LUVs. These negative values might be partly attributed to an effect of the buffer (sucrose buffer without salt). In addition, the difference between LUVs and GUVs might arise from the fact that GUVs have a ~100× larger diameter than LUVs, which makes them more deformable when placed in an electric field (39). Indeed, a prolate deformation of a GUV would presumably decrease the drag force acting on the GUV; hence this would increase its mobility, leading to an apparent larger surface density and thus a more negative potential. Furthermore, the deformation of GUV may depend on the charge density of the GUV: a GUV that possesses a higher charge density will presumably deform more than a GUV with a weaker charge density. Hence, we would expect the difference between the $\zeta$-potential of GUVs and that of LUVs to increase when the % of $PIP_2$ increases, as observed experimentally (Fig. 2 *A*).

POPS is often used as negatively charged lipid to mimic the composition of the inner plasma membrane, either alone or in combination with $PIP_2$ (10,26). In addition, POPS has been reported to bind nonspecifically to many types of proteins, including MARCKS (40) and the matrix protein of vesicular stomatitis virus (41). Thus, POPS-containing GUVs prove as a useful control to check for nonspecific electrostatic interactions between a protein and a negatively charged lipidic membrane. The $\zeta$-potential of GUVs fabricated from a

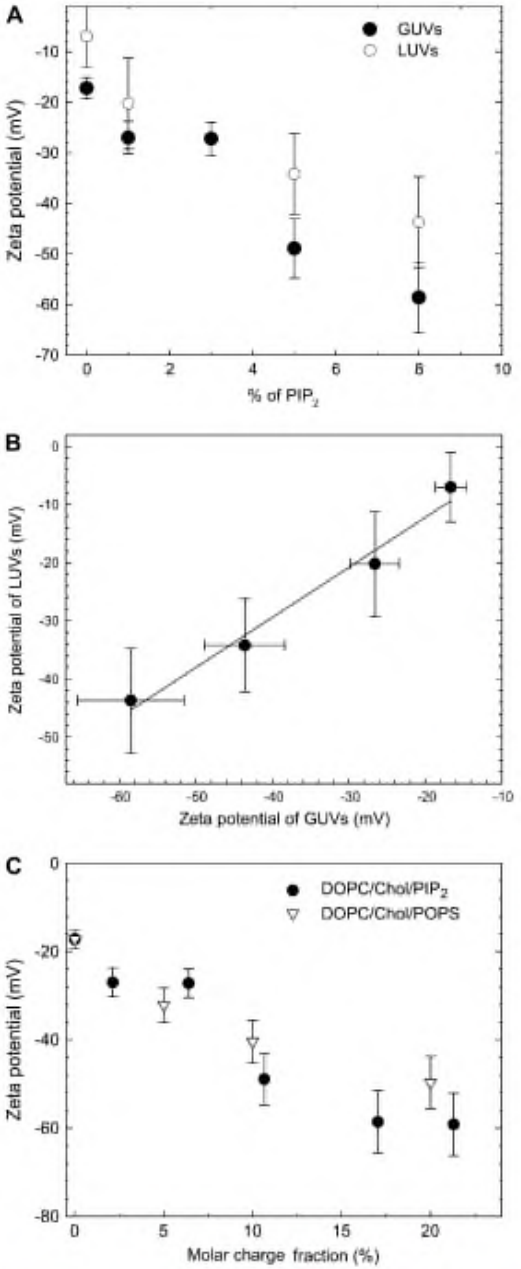



FIGURE 2 Comparison of GUVs with LUVs and of $PIP_2$-GUVs with POPS-GUVs. (*A*) $\zeta$-Potential of GUVs as compared to that of LUVs with the same initial lipid mixture (DOPC/Chol/$PIP_2$) with various amounts of $PIP_2$. (*B*) $\zeta$-Potential of LUVs plotted as a function of that of GUVs for a given % of $PIP_2$ in the initial lipid mixture for measurement made at 24 h (same data as in Fig. 2 *A*). The linear regression has a slope of 0.86. (*C*) $\zeta$-Potential of GUVs electroformed from a lipid mixture containing increasing percentages of $PIP_2$ as compared to that of GUVs electroformed from a lipid mixture containing increasing percentages of POPS. For direct comparison, the data have been plotted on the same *x* axis as a function of the molar charge density, considering that each POPS molecule possesses one charge and each $PIP_2$ molecule possesses three charges.

lipid mixture composed of DOPC, cholesterol and various amounts of POPS (up to 20% in weight) have been measured. Similarly to our findings with $PIP_2$, we measured that the $\zeta$-potential decreases as the amount of POPS increases. It has been reported that $PIP_2$ has a net charge of $-3$ and that POPS has a net charge of $-1$ (20). Therefore, to directly compare the results obtained with $PIP_2$ and with POPS, we have plotted in Fig. 2 *C* the two sets of data as a function of the molar charge fraction of the initial lipid mixture. Both sets of data are in good agreement and fall over a unique curve. On the one hand, this indicates that the approximation of one $PIP_2$ equals 3 POPS (as far as the electric charge is concerned) is valid. On the other hand, this confirms the similar incorporation of POPS and $PIP_2$ in the membrane of GUVs prepared by electroformation. This is consistent with our observation that a saturation of the $\zeta$-potential is measured for mass fraction of $PIP_2$ >8% (Fig. 1 *B*). In all cases, a limit to the incorporation of negatively charged lipids into GUVs made by electroformation seems to be set to a molar charge fraction of ~20%, hence a mass fraction of $PIP_2$ of the order of 8% (Fig. 2 *C*), whereas up to 20% of $PIP_2$ can be incorporated in LUVs without evidence for a saturation of the $\zeta$-potential (22). This finding is in agreement with previous reports that show that GUVs cannot be formed by electroformation from a lipid mixture containing 20% POPS (25).

## Visualization of $PIP_2$ in the membrane of GUVs

The effective incorporation of fluorescent $PIP_2$ can be qualitatively observed using BODIPY-labeled $PIP_2$. Fluorescent long-chain (C16) $PIP_2$ analogs were used in this study because our initial attempts to insert the short-chain (C6) BODIPY labeled $PIP_2$ were always unsuccessful for both TMR- and FL-$PIP_2$. Moreover, we noticed that the long chain ones did not incorporate into the GUVs membrane by electroformation when experiments were carried out at 25°C but were incorporated when carried out at 38°C (Fig. 3, *A* and *B*). Finally, TMR-$PIP_2$ was systematically found to exhibit a preferential orientation in the membrane of GUVs, as shown by a modulation linear with the square of the angle sine of the azimuthal intensity, when the GUVs were observed with the linearly polarized light of the laser of the confocal microscope (42) (Fig. 3 *B*). A modulation of the intensity was never observed for FL-$PIP_2$ (Fig. 3 *A*). This difference has presumably to be attributed to the more hydrophobic and less flexible fluorescent dye of the TMR-$PIP_2$ molecule than that of the FL-$PIP_2$ molecule, which results in a more ordered insertion of the TMR-$PIP_2$ molecule in the lipid bilayer. Noticeably, when TMR-$PIP_2$ micelles were added to a suspension of GUVs formed previously, TMR-$PIP_2$ incorporated spontaneously the membrane of the GUVs, whereas unlabeled $PIP_2$ (as checked with $PIP_2$ antibodies) or FL-$PIP_2$ did not, as checked with $PIP_2$ antibodies-labeling (data not shown).

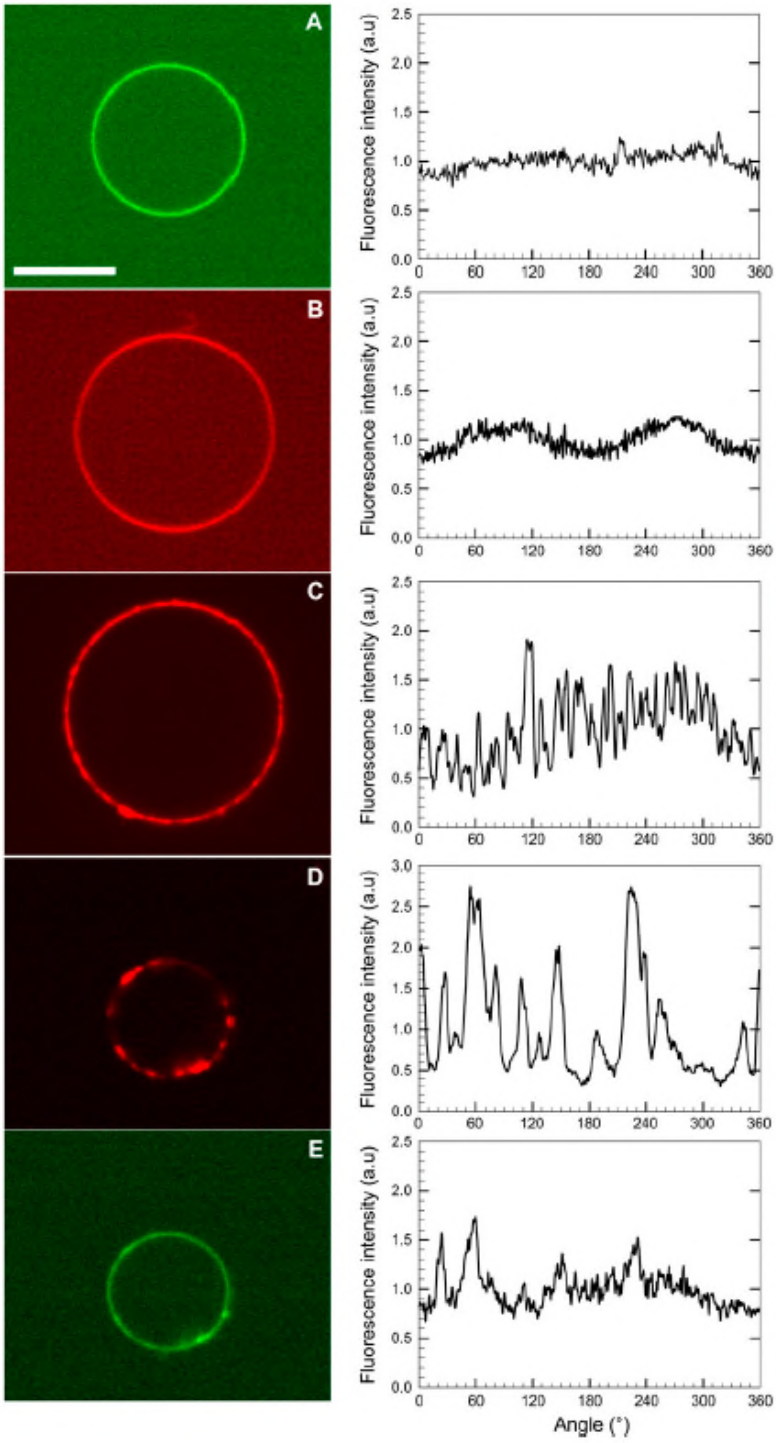



FIGURE 3 Confocal microscopy observations of $PIP_2$ insertion in GUVs. (*A* and *B*) Direct observation of the GUVs by insertion (*A*) of 0.1% FL-$PIP_2$ (C16) in the initial lipid mixture, DOPC/Chol/$PIP_2$/FL-$PIP_2$ 80:15:4.9:0.1, (*B*) of 0.1% TMR-$PIP_2$ (C16) in the initial lipid mixture, DOPC/Chol/$PIP_2$/TMR-$PIP_2$ 80:15:4.9:0.1. Indirect observation of $PIP_2$-containing GUVs (DOPC/Chol/$PIP_2$, (80:15:5) by immunolabeling with $PIP_2$ secondary (*C*) and tertiary (*D*) antibodies. In (*C*), RAM-Alexa 568 secondary fluorescent antibodies were used. In (*D*), unlabeled goat anti-mouse antibody (GAM) followed by donkey anti-goat antibodies (tertiary antibodies) coupled to Alexa 488 (DAG-Alexa 488) were used. (*E*) Direct observation of FL-$PIP_2$ for the same GUVs as (*D*) (composition similar to *A*). Scale bars: 10 $\mu$m. On the right hand side of the images, the corresponding fluorescence intensity profiles along the GUV contour are plotted.

Noticeably, the membrane of GUVs labeled with FL-$PIP_2$ appears homogeneous without clusters. We measured $\sigma/I_{MEAN} = (9.8 \pm 1.9)$ % in the sucrose buffer, and $\sigma/I_{MEAN} = (8.7 \pm 1.2)$ %, in the ezrin buffer. Hence, in the following, $\sigma/I_{MEAN}$ of the order of 10 was taken as the reference value for a homogeneous labeling.

We also verified that the $\zeta$-potential of GUVs made from a lipid mixture containing 4.9% of unlabeled $PIP_2$ and only a trace (0.1%) of fluorescent FL-$PIP_2$ ($\xi = (-47.3 \pm 5.6)$ mV) was close to that of GUVs made from a lipid mixture containing only 5% of unlabeled $PIP_2$, ($\xi = (-48.9 \pm 5.9)$ mV). This indicates that the 0.1% of fluorescent lipid inserted in the membrane does not contribute to the overall potential, as expected. It is important to note that TMR-$PIP_2$ and FL-$PIP_2$ are used here as tracers. Thus, only a very small fraction of % of these lipids (<0.5%) is required to visualize the membrane. Indeed, the limit of self-quenching of these lipids is ~1% of TMR-$PIP_2$ (26) and 0.8% for BODIPY FL-$PIP_2$ (Fig. S2 in Supplementary Material, Data S1), as determined by fluorescence spectroscopy of LUVs containing increasing percentages of FL-$PIP_2$.

Thus, in the following, the total $PIP_2$ percentage was fixed at 5% as the GUVs and when fluorescent $PIP_2$ was used, it was always added at 0.1% (2% of the total amount of $PIP_2$).

Alternatively, it is possible to visualize the presence of $PIP_2$ in the membrane by labeling it with primary antibodies against $PIP_2$ and then secondary antibodies coupled to a fluorescent dye (Fig. 3 *C*), or with unlabeled secondary antibodies followed by labeled tertiary antibodies, to build larger complexes (Fig. 3 *D*). We observed in this case the presence of patches for labeled antibodies, an aspect with was never observed for direct insertion of fluorescent $PIP_2$ (Figs. 3, *A* and *B*, and 4). More quantitatively, $\sigma/I_{MEAN} = (8.7 \pm 1.1)$ %, for FL-$PIP_2$-labeling in the absence of $PIP_2$ antibodies (Fig. 3 *A*), $\sigma/I_{MEAN} = (27.4 \pm 6.5)$ % for fluorescent secondary antibodies (Fig. 3 *C*), and $\sigma/I_{MEAN} = (44.9 \pm 14.9)$ % (Fig. 3 *D*) for fluorescent tertiary antibodies (Fig. 4, *three first columns*). Noticeably, when FL-$PIP_2$ was observed in the GUVs in contact with the tertiary antibodies, the membrane of the GUVs appears more homogeneous than when the fluorescence of the tertiary antibodies is measured (Fig. 3, *E* and *D*). We found $\sigma/I_{MEAN} = (19.5 \pm 7.5)$ % for FL-$PIP_2$ direct visualization, whereas $\sigma/I_{MEAN} = (44.9 \pm 14.9)$ % tertiary antibodies visualization (Fig. 4, *4th column*). Hence the apparent heterogeneous character of the membrane of the GUV increases with the size of the detection molecule: fluorescent secondary antibodies might induce some $PIP_2$ clustering, which is enhanced when larger anti-$PIP_2$ complexes (unlabeled secondary antibodies followed by the addition of fluorescent tertiary antibodies) are used. However, direct visualization of fluorescent $PIP_2$ and indirect visualization through antibodies, provide quantitatively different results for clustering effects, which suggest that the clustering effect visualized via antibodies is essentially artifactual.

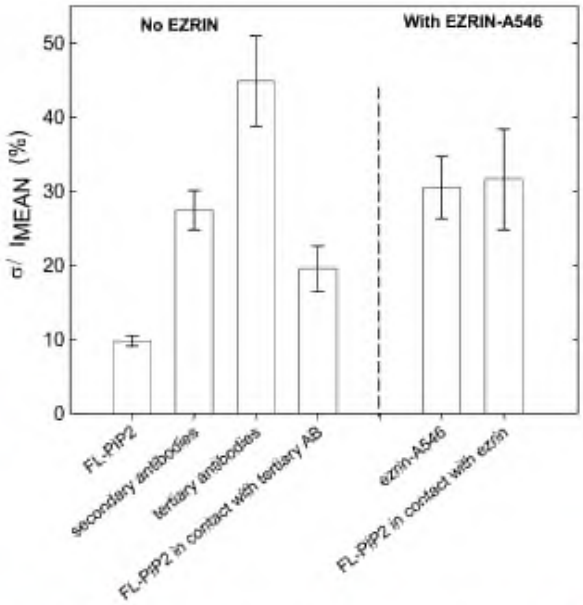



FIGURE 4 Analysis of the heterogeneities in the GUV membranes. The ratio of the SD of the fluorescence signal along the GUV membrane divided by the mean intensity of the GUV membrane ($\sigma/I_{MEAN}$) is given as mean ± SE for all the GUVs analyzed. The first four columns correspond to experiments carried out in the absence of ezrin in the following order: labeled $PIP_2$-GUVs using direct labeling or indirect labeling with secondary and tertiary antibodies, (columns 1, 2, and 3, respectively). Column 4 is the observation of FL-$PIP_2$ GUVs labeled with tertiary antibodies (observation in the green channel whereas antibodies are observed in the red channel). The last two columns correspond to images taken in the presence of ezrin in solution: in this case, either ezrin-Alexa546 (column 5) or FL-$PIP_2$ (column 6) were observed. All these experiments were carried out in the ezrin buffer.

## Stability of GUVs in physiological medium and in the presence of divalent ions

First, we verified that the size distribution of GUVs made from a lipid mixture containing 5% $PIP_2$ was not different from that of pure DOPC/Chol vesicles. The median diameter was 8 $\mu$m for GUVs without $PIP_2$ and 9 $\mu$m for GUVs with $PIP_2$, as evaluated by analyzing more than 160 GUVs for each condition. As the GUVs prepared by electroformation were suspended in a sucrose solution, a transfer in a physiological medium was necessary if the GUVs had to be used for protein/membrane studies (13,14). Therefore, we took care that the osmolarity of the ezrin buffer into which the GUVs could eventually be resuspended, (184 ± 3) mOsm was slightly higher than that of the initial sucrose buffer, (174 ± 3) mOsm, so that the GUVs were always slightly deflated and therefore fluctuating (43). The transfer into a salty medium may render the GUVs more fragile and with time could induce some defects, in particular because of the existence of a transmembrane electric potential. However, we measured for FL-$PIP_2$- labeled GUVs that $\sigma/I_{MEAN} = (9.8 \pm 1.9)$ % in the sucrose buffer, (8.7 ± 1.1) % just after immersion in the ezrin

buffer, and (9.7 ± 2.1) % after 2 h in this buffer. Thus, the immersion in the ezrin buffer did not affect the homogeneity of the GUV membrane.

In view of the investigation of biological phenomena, it is crucial to quantify the stability of GUVs when put into contact with divalent cations like $Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$ as these ions are important in many physiological processes, including interaction of several proteins, including annexin 2 with membranes (14) and polymerization of actin (44). Indeed, these ions have been reported to interact with the phosphate groups of $PIP_2$ (20). Thus, we investigated the contact of these ions with $PIP_2$-containing GUVs and labeled with FL-$PIP_2$. Before contact, the vesicles exhibited a homogenous $PIP_2$ distribution (Fig. 3 *A*). However, low amounts of $Mg^{2+}$ and $Ca^{2+}$ (for concentrations >25 $\mu$M for $Ca^{2+}$ and >300 $\mu$M for $Mg^{2+}$) induced the formation of clusters leading to $\sigma/I_{MEAN} > 20\%$ (Fig. 5, *A–C*). Interestingly, these clusters or aggregates could only be observed in fluorescence microscopy and were not visible by differential interference contrast microscopy, which indicates that the formation of these clusters is neither associated to a shape change of the GUVs nor to a visible aggregation of the lipid membrane, but only to $PIP_2$ aggregation. When the ions concentrations were higher (>300 $\mu$M for $Ca^{2+}$ and >1 mM for $Mg^{2+}$), vesicles rupture within 10 min was also observed. We have plotted in Fig. 5 *C* $\sigma/I_{MEAN}$ as a function of the concentration of divalent ions in the external medium (analysis was carried out 10 min after addition of the ions). We found that, for both ions, the heterogeneity of the GUVs increases steadily. Fig. 5 *C* also shows that GUVs were more sensitive to $Ca^{2+}$ than to $Mg^{2+}$.

### $PIP_2$-containing GUVs interact with ezrin

We subsequently investigated the interactions of the $PIP_2$-containing GUVs with ezrin, a protein that possesses a FERM domain at its N-terminal and interacts with lipid membranes via that domain. Indeed, ezrin has already been shown to interact with $PIP_2$-containing SLBs (12), with $PIP_2$-containing LUVs (22), and with giant vesicles made by the gentle hydration method (27).

The $PIP_2$-containing GUVs (composition of the initial lipid mixture DOPC/Chol/$PIP_2$, 80:15:5) were introduced in a chamber containing ezrin, with a concentration in the range of 14–22 $\mu$M. Such high concentration of ezrin was chosen to ensure that a large amount of protein was available for lipid binding, as the affinity of ezrin to $PIP_2$-LUVs was found to be ~5 $\mu$M (22) (see details in Data S1). We observed that ezrin localized at the membrane of GUVs only in the case where $PIP_2$ was inserted in the membrane (Fig. 6 *B*). When $PIP_2$ was replaced by POPS introduced at a higher percentage (15%) as a negative control (Fig. 6 *C*), the membrane of GUVs was never labeled, similarly to what was observed with pure DOPC/Chol GUVs (Fig. 6 *A*). The mean radial concentration profile of ezrin (calculated for 14 GUVs in each condition) quantifies the increase of ezrin concentration in the close vicinity of the membrane of GUVs when their membrane appeared labeled (Fig. 6 *D*). The fluorescence intensity of the ezrin-labeled GUVs membrane was at most 1.94 times higher than the fluorescence of the exterior, indicating that the local

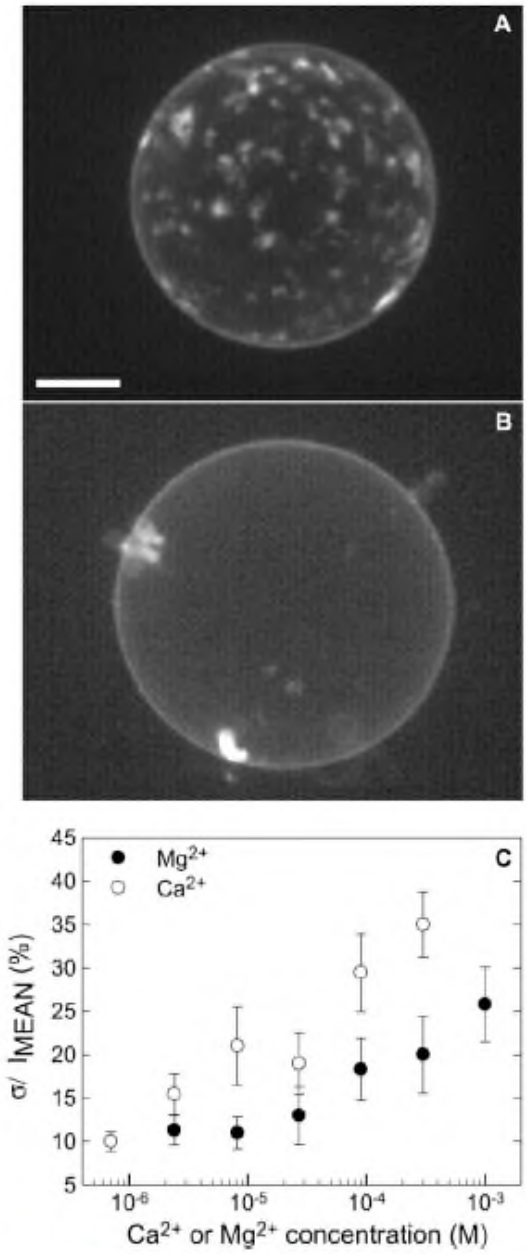



FIGURE 5 Effect of divalent ions on $PIP_2$-containing GUVs (composition of the initial lipid mixture DOPC/Chol/$PIP_2$/FL-$PIP_2$, 80/15/4.9/0.1). Projections of a stack of images taken by confocal microscopy at different height of GUVs in the glucose buffer (*A*) with 90 $\mu$M $Ca^{2+}$; (*B*) with 90 $\mu$M $Mg^{2+}$; (*C*) ($\sigma/I_{MEAN}$) for the GUVs as a function of the $Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$ concentration in solution. Scale bar: 10 $\mu$m.

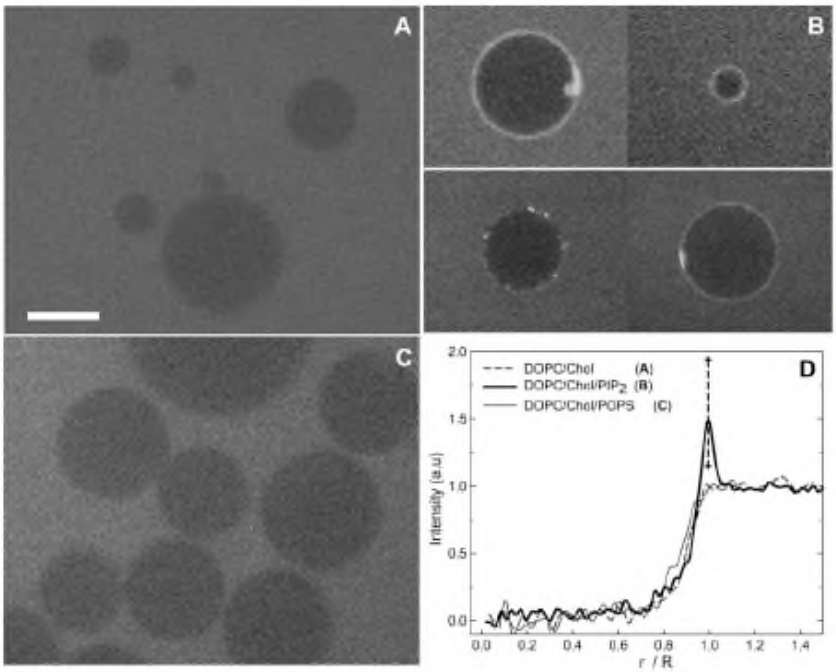



FIGURE 6 Contact between GUVs and ezrin (mixture containing 15 $\mu$M of WT ezrin and 200 nM of ezrin-Alexa488). (*A*) GUVs composed only of DOPC and cholesterol (DOPC/Chol 85:15). (*B*) GUVs containing $PIP_2$ (DOPC/Chol/$PIP_2$, 80:15:5). (*C*) GUVs containing POPS as negatively charged lipid (DOPC/Chol/POPS, 70:15:15). (*D*) The radial concentration profiles of ezrin for the three different types of GUVs are represented after normalization (the distance $r$ from the center of the GUV is normalized by the radius of the vesicle $R$; the fluorescence intensity is normalized such as it is equal to 0 inside the GUV and 1 in the external medium.). Each profile represents the mean of 14 different profiles from individual GUVs. The dotted vertical line shows the range of values measured for the height of the peak (between 1.15 and 1.94). The scale is the same for the three pictures. Scale bar: 10 $\mu$m.

ezrin concentration is roughly twice the concentration in the bulk at most. We noticed that 23% of the GUVs were labeled at their membrane (four independent experiments, 341 GUVs observed in total), whereas for POPS, <1% were labeled (Table 2). Similar percentages of labeled GUVs were observed for GUVs containing unlabeled $PIP_2$ with or without 0.1% of FL-$PIP_2$ (Table 2). This shows that FL-$PIP_2$ does not change the interaction properties of ezrin with $PIP_2$-containing GUVs. At present, there are only few quantitative studies published on GUVs interacting with proteins. When a thorough quantification of the images is carried out, the percentages measured for other proteins interacting with $PIP_2$-containing GUVs (27,45) fall in the range of what is observed in this study. When GUVs were made from a initial lipid mixture containing only DOPC and $PIP_2$ (DOPC/$PIP_2$ 95/5) without cholesterol, this percentage fell to 7% (three independent experiments, 208 GUVs counted) that might be related to the highest and less stable $\zeta$-potential values obtained for these latter GUVs, as if $PIP_2$ was incorporated in smaller quantities or these membranes were less stable.

Importantly, we also verified that ezrin-Alexa488 and ezrin-Alexa546 exhibited a similar behavior that did not depend on the dye properties (Fig. 7). This is an important point as recent experiments using a peptide (MARCKS 151-175) labeled with either Alexa488 (a rather hydrophilic moiety) or Texas Red (a more hydrophobic moiety) showed that the Texas Red labeled peptide did permeate the membrane of GUVs (membrane composition PC/PS/$PIP_2$: 70:30:0.1) and was mostly located inside the GUVs whereas Alexa488 labeled peptide did not permeate the membrane of GUVs (26). These different observations are probably related to the different size of the two proteins, ezrin being indeed much larger than the MARCKS(151–175) peptide (24 amino acids for the peptide versus 586 for ezrin) as well as to the mode of interaction (electrostatic for MARKS, stereospecific for ezrin). In our case, we also confirmed that the percentage of labeled GUVs did not depend on the type of

**TABLE 2 Quantification of the number of ezrin-labeled GUVs and of the presence of clusters for GUVs of different composition**

| GUV composition | Ezrin-labeled GUV (in % of the total GUVs) | Presence of clusters (in % of labeled GUVs) |
|---|---|---|
| Ezrin-Alexa488 | | |
| DOPC/Chol, 85:15 ($n$ = 222) | 0 | - |
| DOPC/Chol/POPS, 70:15:15 ($n$ = 90) | <1 | - |
| DOPC/$PIP_2$, 95:5 ($n$ = 208) | 7 | 79 |
| DOPC/Chol/$PIP_2$ 80:15:5 ($n$ = 537) | 23 | 79 |
| Ezrin-Alexa546 | | |
| DOPC/Chol/$PIP_2$/FL-$PIP_2$ 80:15:4.9:0.1 ($n$ = 51) | 22 | Visualization of ezrin-Alexa546:81<br>Visualization of FL-$PIP_2$:90 |

Clusters were defined as areas with intensities 15% higher than the mean GUV intensity along the contour length, $n$ is the number of GUVs considered.

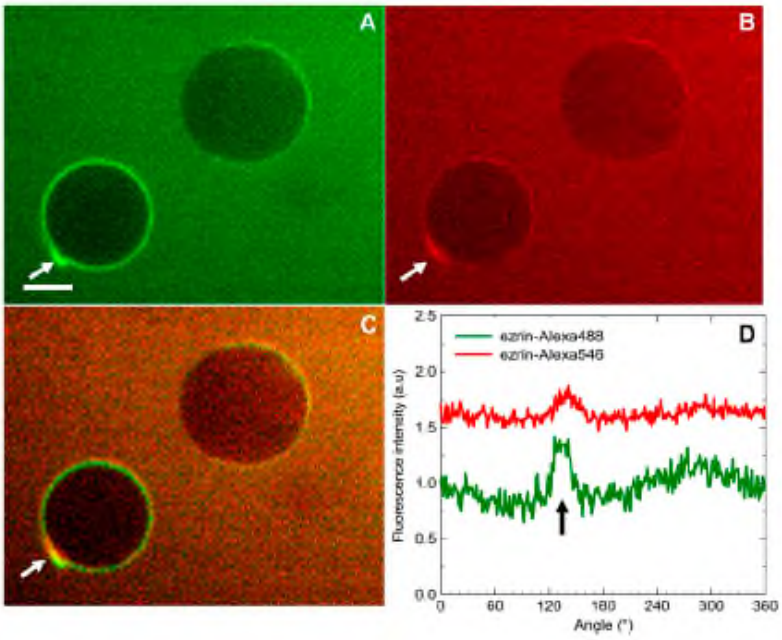



FIGURE 7 $PIP_2$-containing GUVs (DOPC/Chol/$PIP_2$, 80:15:5) in contact with WT and fluorescently labeled ezrin (mixture containing 22 $\mu$M of WT ezrin, 100 nM of ezrin-Alexa488, and 100 nM of ezrin-Alexa546). (*A*) Observation of ezrin-Alexa488 (*green channel*), (*B*) of ezrin-Alexa546 (*red channel*), and (*C*) merge of the green and red channels. (*D*) The intensity profile along the GUV circumference is given for both channels (the first point of the lower profile has been set arbitrary at 1 and the upper curve has been shifted for a better visualization). The arrow indicates a cluster visible in both channels. Scale bar: 10 $\mu$m.

dye. Thus, ezrin-Alexa488 and ezrin-Alexa546 interacted in a similar way with $PIP_2$-containing GUVs (Fig. 7 and Table 2). The heterogeneity of the GUVs membranes in the presence of ezrin (as quantified by the signal of FL-$PIP_2$) was also higher than for GUVs in the absence of ezrin (Fig. 4). We also verified that, for a given GUV, $\sigma/I_{MEAN}$ did not vary over the observation period (~5 min).

When FL-$PIP_2$ was used in combination with Ezrin-Alexa546, we observed that FL-$PIP_2$ and Ezrin-Alexa546 colocalized at the membrane of GUVs and that the distribution of both ezrin-Alexa546 and of FL-$PIP_2$ appeared non uniform with local increase in concentrations in few clustered regions (Figs. 8 and 4, *last two columns*). Indeed, we measured $\sigma/I_{MEAN} = (31.6 \pm 16.6)$ %, for FL-$PIP_2$-labeling and $\sigma/I_{MEAN} = (30.5 \pm 14.7)$ %, for ezrin-Alexa546-labeling.

## DISCUSSION

### Proof for the incorporation of $PIP_2$ in GUVs

Membranes composed of a very limited number of constituents, like DOPC, cholesterol, and $PIP_2$ membranes are often used as biomimetic systems to investigate the properties of $PIP_2$ in the membrane (46) or the interactions of proteins with the membrane (29). Fluorescent labeling by incorporation of fluorescent $PIP_2$ at 0.1% and/or antibodies that label only a very small fraction of the molecules (between 1:1000 to 1:10,000) is convenient for microscopy observations but does not allow any quantitative determination of the degree of incorporation of $PIP_2$ molecules in the lipidic membrane of GUVs, whereas $\zeta$-potential measurements could. However, the quantitative incorporation of $PIP_2$ by $\zeta$-potential measurements has only been proven for multilamellar vesicles (20) and LUVs (22) thus far. This technique is in fact used widely for physico-chemical and pharmaceutical applications of small unilamellar vesicles and LUVs (47), in particular to investigate their stability or the adsorption of cations (48). To the best of our knowledge, measurements of $\zeta$-potential of GUVs have never been reported in the literature previously. Thanks to our measurements of the $\zeta$-potential of GUVs, we were able to provide evidence for i), the effective and quantitative incorporation of $PIP_2$ in GUVs; ii), the similar behavior of POPS and $PIP_2$ in terms of incorporation by electroformation; and iii), a good agreement between GUVs and LUVs prepared by different preparation methods using identical lipid solutions. $\zeta$-Potential measurements appear thus as a new, convenient and rapid tool to check for specific charged lipid insertion in GUVs as well as to evaluate their stability in time. Based on these measurements, we found that i), the $\zeta$-potential of the GUVs made from a lipid mixture containing increasing amount of $PIP_2$ decreases continuously up to a saturation for 8% $PIP_2$; and ii), GUVs made from a lipid mixture containing DOPC, cholesterol, and $PIP_2$ (DOPC/chol/$PIP_2$ 80:15:5) are stable for a least 1 day.

### Role of divalent ions

Investigating the stability of $PIP_2$-containing GUVs is particularly important for future applications where actin or other proteins have to be involved. In fact, $PIP_2$ is known to interact with many actin-binding proteins such as ERM proteins,

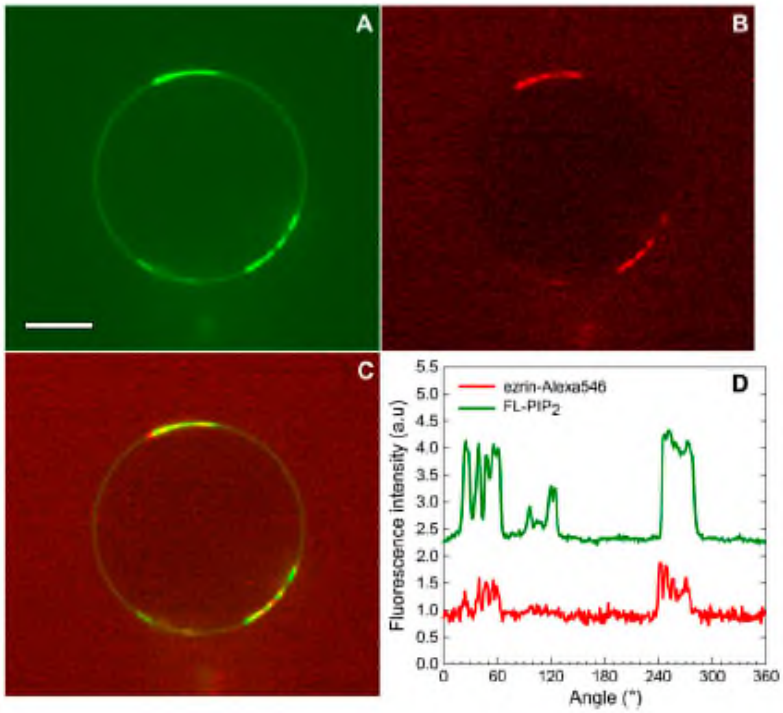



FIGURE 8 Contact between $PIP_2$-containing GUVs labeled with FL-$PIP_2$ and ezrin-Alexa546. (*A*) Observation of a GUV containing 0.1% FL-$PIP_2$ (DOPC/Chol/$PIP_2$/FL-$PIP_2$, 80:15:4.9:0.1). (*B*) Same vesicle as in (*A*) observed in the red channel for visualization of ezrin-Alexa546. (*C*) Merge of the two images. (*D*) Intensity profiles for each channel along the circumference of the GUV (the upper curve has been shifted for better visualization). Scale bar: 10 $\mu$m.

vinculin, talin, profilin, WASP, and N-WASP (4) and biomimetic systems appear as elegant tools to investigate specific interactions of $PIP_2$ and actin binding proteins (13,45). Thus, it is important to fully characterize the behavior of $PIP_2$-GUVs in buffers such as F-actin buffer, which often contains 2 mM $MgCl_2$. In addition, several other proteins like annexins bind to $PIP_2$ in a $Ca^{2+}$- dependent manner (14). Moreover, it is known that divalent ions have an affinity for the phosphate groups of $PIP_2$. Using multilamellar vesicles, McLaughlin et al. (20) estimated the intrinsic association constant of calcium with phosphate groups of $PIP_2$ at $\sim 500\ M^{-1}$ for $Ca^{2+}$ ions and $\sim 100\ M^{-1}$ for $Mg^{2+}$ ions. These authors also showed that calcium concentrations $<100\ \mu M$ do not affect significantly the $\zeta$-potential of PC/$PIP_2$ vesicles. Our results show that $Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$ induce significant $PIP_2$ clustering when added at $\sim 30\ \mu M$ for $Ca^{2+}$ and $\sim 300\ \mu M$ for $Mg^{2+}$. Thus, one has to keep in mind that clusters of $PIP_2$ might preexist when studying GUVs/protein interactions in a F-actin buffer. However, the cellular concentrations of calcium are well below those exerting a deleterious effect on GUVs and most of the magnesium added in the F-actin buffer is complexed with adenosine 5′ triphosphate, as in the cell, and should not alter the stability of GUVs.

## Insertion of synthetic fluorescent $PIP_2$ in the membrane

We showed that long-chain (C16) BODIPY-labeled synthetic $PIP_2$ molecules are needed to get an effective incorporation of these molecules in the membrane of GUVs and that short-chain (C6)-labeled synthetic $PIP_2$ did not enter the membrane of GUVs. As observed previously with experiments using LUVs, this simply reflects that a long, more hydrophobic acyl chain will incorporate a lipid membrane much more easily and will have more difficulty escaping from it than a short, less hydrophobic one (45,48,49) Interestingly, these previous results on LUVs seem to extend to membranes of GUVs as well as, to some extent, to cellular membranes. Thus, Bagatolli et al. (29) found that short-chains TMR and FL-$PIP_2$ do not partition well into the membrane of a GUV. Cho et al. (49) also noticed that the short C6 BODIPY-labeled phosphoinositides were not well localized to the surface membrane but were found equally in cytoplasm. Furthermore, our observations of uniform distributions of TMR-$PIP_2$ and FL-$PIP_2$ in GUVs membranes (Fig. 3, *A* and *B*) suggest that $PIP_2$ molecules do not form domains in DOPC/Chol membranes. This is in agreement with the experimental findings of Fernandez et al. (46) with LUVs and Herrig et al. (12) with $PIP_2$-containing SLBs.

## Protein/GUVs interactions

We used ezrin, a ERM protein, as a model protein for visualizing interactions of proteins with $PIP_2$-containing GUVs. This protein has been used recently to investigate the hole-opening activity of ERM proteins in the membranes of GUVs. In a previous study, Takeda et al. (27) found that high

concentrations of ezrin (15 $\mu$M) were able to open holes in the membranes of GUVs made of phosphatidylcholine and of an anionic lipid phosphatidylglycerol at a 1:1 molar ratio, in a low ionic strength medium. Importantly, ezrin-induced hole formation was insensitive to cholesterol added in the membrane but was sensitive to $PIP_2$ insertion in the membrane. In this latter case, the hole-opening activity was abolished for GUVs containing 10% $PIP_2$. Thus, although carried out in a different suspending medium for GUVs of different lipid composition, our experiments confirm that ezrin does not induce hole in liposomal membranes containing $PIP_2$.

Why relatively high concentrations of ezrin are needed to effectively observe an interaction of ezrin with the membrane of GUVs can be understood from the knowledge of the affinity (~5 $\mu$M for ezrin interaction with $PIP_2$-containing LUVs (22)) and from the known concentration of lipid in solution. In our experimental conditions, using 15 $\mu$M ezrin, 80% of the $PIP_2$ molecules are expected to be bound (Fig. S1 in Data S1), whereas <2.7% of ezrin will be bound. This would explain the profiles given in Fig. 6 *D*, which shows that for GUVs labeled with fluorescent ezrin, the local concentration of ezrin at the membrane is at most about twice the bulk concentration of ezrin.

In addition, our observations suggest that ezrin might be able to reorganize the $PIP_2$ molecules incorporated in the membrane of GUVs upon interaction. Ezrin appears clustered in some places (Figs. 4 and 6–8). Such clustering was already observed by AFM for ezrin interacting with a SLB containing 3% of $PIP_2$ and was attributed to protein/protein interactions at the membrane surface (12). Indeed, we found that GUVs observed via $PIP_2$ antibodies, $PIP_2$ appear clustered, this clustering being enhanced as the size of the detection complex was increased (Figs. 3, *C* and *D*, and 4). A noticeable difference appears when FL-$PIP_2$ was observed on the same GUVs (the tertiary antibodies being observed in the red channel): a more homogeneous distribution is visible in the green channel, where the FL-$PIP_2$ is detected (compare *column 3* and *4* in Fig. 4 *A*). This suggests that the clustering effect observed using antibodies is essentially artifactual and results from the building of large complexes.

## CONCLUSIONS

$\zeta$-Potential measurements allow one to follow unlabeled $PIP_2$ insertion in the membrane of GUVs fabricated by the electroformation technique. Long-chain (C16) fluorescent $PIP_2$ analogs (TMR-$PIP_2$ and FL-$PIP_2$) were used as tracers (0.1%) for visualizing the membrane by confocal microscopy. The homogeneity of the membrane of $PIP_2$-containing GUVs was quantified using the SD of the fluorescence intensity along the GUV contour and was found to depend of the method of observation: antibodies against $PIP_2$ appear clustered, the clustering depending on the size of the antibodies, whereas TMR- and FL-$PIP_2$ appear homogenously distributed in the membrane. The $PIP_2$-containing GUVs were used for subsequent ezrin/GUVs interaction studies using either fluorescently-labeled GUVs, fluorescently-labeled ezrin, or both. Ezrin was found to interact with the GUVs leading to a reorganization of $PIP_2$ on interaction. Ezrin bound similarly to GUVs containing only unlabeled $PIP_2$ or unlabeled $PIP_2$ with 0.1% FL-$PIP_2$. Besides a number of transmembrane ligands, ezrin is also an actin binding protein, which justifies its role as a membrane-cytoskeleton linker (50). We believe the characterization of a biomimetic system presented in this study is obviously the first step for understanding the mechanisms of the morphogenic properties of ezrin. More widely, these biomimetic vesicles can also be used for investigation of phosphoinositide containing GUVs with several other types of proteins.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

To view all of the supplemental files associated with this article, visit www.biophysj.org.

We are grateful to Michel Terray and Sandrine Vieules from Malvern Instruments for providing the Zeta NanoZS apparatus. We thank Andrea Parmeggiani (Université de Montpellier 2) for fruitful discussions as well as Pierre-Emmanuel Milhiet and Christian Legrimellec (Centre de Biochimie Structurale, Montpellier) for their technical advices. C.P. is a Junior Member of the Institut Universitaire de France whose support is gratefully acknowledged.

This work was supported in part by the European Network of Excellence NoE "SoftComp" (NMP3-CT-2004-502235).

## REFERENCES

1. Payrastre, B., K. Missy, S. Giuriato, S. Bodin, M. Plantavid, and M. Gratacap. 2001. Phosphoinositides: key players in cell signaling, in time and space. *Cell. Signal.* 13:377–387.
2. Yin, H. L., and P. A. Janmey. 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* 65:761–789.
3. Ling, K., N. J. Schill, M. P. Wagoner, Y. Sun, and R. A. Anderson. 2006. Movin' on up; the role of PtdIns(4,5)P(2) in cell migration. *Trends Cell Biol.* 16:276–284.
4. Niggli, V. 2005. Regulation of protein activities by phosphoinositide phosphates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:57–79.
5. Martin, T. F. 2001. PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:493–499.
6. Simonsen, A., A. E. Wurmser, S. D. Emr, and H. Stenmark. 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:485–492.
7. McLaughlin, S., and D. Murray. 2005. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature.* 438:605–611.
8. Tall, E. G., I. Spector, S. N. Pentyala, I. Bitter, and M. J. Rebecchi. 2000. Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures. *Curr. Biol.* 10:743–746.
9. Wang, J., A. Gambhir, G. Hangyas-Mihalyne, D. Murray, U. Golebiewska, and S. McLaughlin. 2002. Lateral sequestration of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by the basic effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate is due to nonspecific electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.* 277:34401–34412.
10. Hokanson, D. E., and E. M. Ostap. 2006. Myo1c binds tightly and specifically to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:3118–3123.

11. Wagner, M. L., and L. K. Tamm. 2001. Reconstituted syntaxin1a/SNAP25 interacts with negatively charged lipids as measured by lateral diffusion in planar supported bilayers. *Biophys. J.* 81:266–275.

12. Herrig, A., M. Janke, J. Austermann, V. Gerke, A. Janshoff, and C. Steinem. 2006. Cooperative adsorption of ezrin on PIP2-containing membranes. *Biochemistry*. 45:13025–13034.

13. Liu, A. P., and D. A. Fletcher. 2006. Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. *Biophys. J.* 91:4064–4070.

14. Gokhale, N. A., A. Abraham, M. A. Digman, E. Gratton, and W. Cho. 2005. Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J. Biol. Chem.* 280:42831–42840.

15. Buser, C. A., and S. McLaughlin. 1998. Ultracentrifugation technique for measuring the binding of peptides and proteins to sucrose-loaded phospholipid vesicles. *Methods Mol. Biol.* 84:267–281.

16. Rusu, L., A. Gambhir, S. McLaughlin, and J. Radler. 2004. Fluorescence correlation spectroscopy studies of peptide and protein binding to phospholipid vesicles. *Biophys. J.* 87:1044–1053.

17. Richter, R. P., and A. R. Brisson. 2005. Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophys. J.* 88:3422–3433.

18. Baumgart, T., S. T. Hess, and W. W. Webb. 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*. 425:821–824.

19. Staneva, G., M. Seigneuret, K. Koumanov, G. Trugnan, and M. I. Angelova. 2005. Detergents induce raft-like domains budding and fission from giant unilamellar heterogeneous vesicles: a direct microscopy observation. *Chem. Phys. Lipids*. 136:55–66.

20. Toner, M., G. Vaio, A. McLaughlin, and S. McLaughlin. 1988. Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry*. 27:7435–7443.

21. Sengupta, P., M. J. Ruano, F. Tebar, U. Golebiewska, I. Zaitseva, C. Enrich, S. McLaughlin, and A. Villalobo. 2007. Membrane-permeable calmodulin inhibitors (e.g., W-7/W-13) bind to membranes, changing the electrostatic surface potential: dual effect of W-13 on epidermal growth factor receptor activation. *J. Biol. Chem.* 282:8474–8486.

22. Blin, G., E. Margeat, C. Royer, C. Roy, and C. Picart. 2008. Quantitative analysis of the interaction of ezrin with large unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol(4,5) bisphosphate. *Biophys. J.* 94:1021–1033.

23. Akashi, K., H. Miyata, H. Itoh, and K. Kinosita, Jr. 1996. Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. *Biophys. J.* 71:3242–3250.

24. 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.

25. Rodriguez, N., F. Pincet, and S. Cribier. 2005. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 42:125–130.

26. Gambhir, A., G. Hangyas-Mihalyne, I. Zaitseva, D. S. Cafiso, J. Wang, D. Murray, S. N. Pentyala, S. O. Smith, and S. McLaughlin. 2004. Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys. J.* 86:2188–2207.

27. Takeda, S., A. Saitoh, M. Furuta, N. Satomi, A. Ishino, G. Nishida, H. Sudo, H. Hotani, and K. Takiguchi. 2006. Opening of holes in liposomal membranes is induced by proteins possessing the FERM domain. *J. Mol. Biol.* 362:403–413.

28. Golebiewska, U., A. Gambhir, G. Hangyas-Mihalyne, I. Zaitseva, J. Radler, and S. McLaughlin. 2006. Membrane-bound basic peptides sequester multivalent (PIP2), but not monovalent (PS), acidic lipids. *Biophys. J.* 91:588–599.

29. Moens, P. D., and L. A. Bagatolli. 2007. Profilin binding to sub-micellar concentrations of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate and phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate. *Biochim. Biophys. Acta*. 1768:439–449.

30. Sugiura, Y. 1981. Structure of molecular aggregates of 1-(3-*sn*-phosphatidyl)-L-myo-inositol 3,4-bis(phosphate) in water. *Biochim. Biophys. Acta*. 641:148–159.

31. Roy, C., M. Martin, and P. Mangeat. 1997. A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding. *J. Biol. Chem.* 272:20088–20095.

32. Angelova, M. I., S. Soleau, P. Meleard, J. F. Faucon, and P. Bothorel. 1992. Preparation of giant vesicles by external AC fields. Kinetics and application. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 89:127–131.

33. Romer, W., L. Berland, V. Chambon, K. Gaus, B. Windschiegl, D. Tenza, M. R. Aly, V. Fraisier, J. C. Florent, D. Perrais, C. Lamaze, G. Raposo, C. Steinem, P. Sens, P. Bassereau, and L. Johannes. 2007. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*. 450:670–675.

34. Hunter, R. J. 1981. $\zeta$-Potential in Colloid Science. New York: Academic Press.

35. Henriksen, J., A. C. Rowat, and J. H. Ipsen. 2004. Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity. *Eur. Biophys. J.* 33:732–741.

36. Kakorin, S., U. Brinkmann, and E. Neumann. 2005. Cholesterol reduces membrane electroporation and electric deformation of small bilayer vesicles. *Biophys. Chem.* 117:155–171.

37. Hatzi, P., S. Mourtas, P. G. Klepetsanis, and S. G. Antimisiaris. 2007. Integrity of liposomes in presence of cyclodextrins: effect of liposome type and lipid composition. *Int. J. Pharm.* 333:167–176.

38. Riske, K. A., and R. Dimova. 2005. Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophys. J.* 88:1143–1155.

39. Dimova, R., K. A. Riske, S. Aranda, N. Bezlyepkina, R. L. Knorr, and R. Lipowsky. 2007. Giant vesicles in electric fields. *Soft Matter*. 3:817–827.

40. McLaughlin, S., J. Wang, A. Gambhir, and D. Murray. 2002. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:151–175.

41. Solon, J., O. Gareil, P. Bassereau, and Y. Gaudin. 2005. Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system. *J. Gen. Virol.* 86:3357–3363.

42. Sandre, O. 2000. PhD thesis, Pores transitoires, adhésion et fusion de vésicules géantes. Paris: University Paris 6. 195 p.

43. Papadopulos, A., S. Vehring, I. Lopez-Montero, L. Kutschenko, M. Stockl, P. F. Devaux, M. Kozlov, T. Pomorski, and A. Herrmann. 2007. Flippase activity detected with unlabeled lipids by shape changes of giant unilamellar vesicles. *J. Biol. Chem.* 282:15559–15568.

44. Cooper, J. A., S. B. Walker, and T. D. Pollard. 1983. Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4:253–262.

45. Heuvingh, J., M. Franco, P. Chavrier, and C. Sykes. 2007. ARF1-mediated actin polymerization produces movement of artificial vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:16928–16933.

46. Fernandes, F., L. M. Loura, A. Fedorov, and M. Prieto. 2006. Absence of clustering of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in fluid phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* 47:1521–1525.

47. Takeuchi, H., H. Yamamoto, and Y. Kawashima. 2001. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47:39–54.

48. Garbuzenko, O., S. Zalipsky, M. Qazen, and Y. Barenholz. 2005. Electrostatics of PEGylated micelles and liposomes containing charged and neutral lipopolymers. *Langmuir*. 21:2560–2568.

49. Cho, H., Y. A. Kim, J. Y. Yoon, D. Lee, J. H. Kim, S. H. Lee, and W. K. Ho. 2005. Low mobility of phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate underlies receptor specificity of Gq-mediated ion channel regulation in atrial myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:15241–15246.

50. Bretscher, A., D. Reczek, and M. Berryman. 1997. Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J. Cell Sci.* 110:3011–3018.

51. Tong, J., L. Nguyen, A. Vidal, S. A. Simon, J. H. Skene, and T. J. McIntosh. 2007. Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) to raft bilayers. *Biophys. J.*

**(Alberts et al. 2008)** Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Peter Walter, Julian Lewis, Martin Raff, et Keith Roberts. 2008. Molecular Biology of the Cell. 5 éd. Garland Publishing Inc, Janvier 2.

**(Algrain et al. 1993)** Algrain, M, O Turunen, A Vaheri, D Louvard, et M Arpin. 1993. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *The Journal of Cell Biology* 120, no. 1 (Janvier): 129-139.

**(Amann et al. 2001)** Amann, K J, et T D Pollard. 2001. Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, no. 26 : 15009-15013.

**(Angelova et al. 1986)** Angelova, MI, et DS Dimitrov. 1986. Liposome electroformation. *faraday discussions* 81: 303+.

**(Auvinen et al. 2007)** Auvinen, Eeva, Niina Kivi, et Antti Vaheri. 2007. Regulation of ezrin localization by Rac1 and PIPK in human epithelial cells. *Experimental Cell Research* 313, no. 4 (Février 15): 824-833.

**(Bangham et al. 1965)** Bangham, A D, M M Standish, et J C Watkins. 1965. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* 13, no. 1 (Août): 238-252.

**(Barret et al. 2000)** Barret, C, C Roy, P Montcourrier, P Mangeat, et V Niggli. 2000. Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *The Journal of Cell Biology* 151, no. 5 (Novembre 27): 1067-1080.

**(Berridge et al. 1984)** Berridge, M J, J P Heslop, R F Irvine, et K D Brown. 1984. Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor. *The Biochemical Journal* 222, no. 1 (Août 15): 195-201.

**(Berryman et al. 1993)** Berryman, M, Z Franck, et A Bretscher. 1993. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *Journal of Cell Science* 105 ( Pt 4) (Août): 1025-1043.

**(Berryman et al. 1995)** Berryman, M, R Gary, et A Bretscher. 1995. Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 131, no. 5 (Décembre): 1231-1242.

**(Bethoney et al. 2009)** Bethoney, Kelley A, Megan C King, Jenny E Hinshaw, E Michael Ostap, et Mark A Lemmon. 2009. A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 32 (Août 11): 13359-13364.

**(Blin et al. 2008)** Blin, Guillaume, Emmanuel Margeat, Kévin Carvalho, Catherine A Royer, Christian Roy, et Catherine Picart. 2008. Quantitative analysis of the binding of ezrin to large unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate. *Biophysical Journal* 94, no. 3 (Février 1): 1021-1033.

**(Brault et al. 2001)** Brault, E, A Gautreau, M Lamarine, I Callebaut, G Thomas, et L Goutebroze. 2001. Normal membrane localization and actin association of the NF2 tumor suppressor protein are dependent on folding of its N-terminal domain. *Journal of Cell Science* 114, no. Pt 10 (Mai): 1901-1912.

**(Bretscher et al. 1983)** Bretscher, A. 1983. Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *The Journal of Cell Biology* 97, no. 2 (Août): 425-432.

**(Bretscher et al. 1995)** Bretscher, A, R Gary, et M Berryman. 1995. Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry* 34, no. 51 (Décembre 26): 16830-16837.

**(Bretscher et al. 1997)** Bretscher, A, D Reczek, et M Berryman. 1997. Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *Journal of Cell Science* 110 ( Pt 24) (Décembre): 3011-3018.

**(Bretscher et al. 2002)** Bretscher, Anthony, Kevin Edwards, et Richard G Fehon. 2002. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3, no. 8 (Août): 586-599.

**(Bugyi et al. 2008)** Bugyi, Beáta, Christophe Le Clainche, Guillaume Romet-Lemonne, et Marie-France Carlier. 2008. How do in vitro reconstituted actin-based motility assays provide insight into in vivo behavior? *FEBS Letters* 582, no. 14 (Juin 18): 2086-2092.

**(Carlier et al. 1997)** Carlier, M F, V Laurent, J Santolini, R Melki, D Didry, G X Xia, Y Hong, N H Chua, et D Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *The Journal of Cell Biology* 136, no. 6 (Mars 24): 1307-1322.

**(Charras et al. 2006)** Charras, Guillaume T, Chi-Kuo Hu, Margaret Coughlin, et Timothy J Mitchison. 2006. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *The Journal of Cell Biology* 175, no. 3 (Novembre 6): 477-490.

**(Charrin et al. 2006)** Charrin, Stephanie, et Andres Alcover. 2006. Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 11: 1987-1997.

**(Chaudhary et al. 1998)** Chaudhary, A, J Chen, Q M Gu, W Witke, D J Kwiatkowski, et G D Prestwich. 1998. Probing the phosphoinositide 4,5-bisphosphate binding site of human profilin I. *Chemistry & Biology* 5, no. 5 (Mai): 273-281.

**(Chisti et al. 1998)** Chishti, Athar H., Anthony C. Kim, Shirin M. Marfatia, Mohini Lutchman, Manjit Hanspal, Hitesh Jindal, Shih-Chun Liu, et al. 1998. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends in Biochemical Sciences* 23, no. 8 (Août 1): 281-282.

**(Clarke et al. 2001)** Clarke, J H, A J Letcher, C S D'santos, J R Halstead, R F Irvine, et N Divecha. 2001. Inositol lipids are regulated during cell cycle progression in the nuclei of murine erythroleukaemia cells. *The Biochemical Journal* 357, no. Pt 3 (Août 1): 905-910.

**(Cooper et al. 1983)** Cooper, J A, E L Buhle, S B Walker, T Y Tsong, et T D Pollard. 1983. Kinetic evidence for a monomer activation step in actin polymerization. *Biochemistry* 22, no. 9 (Avril 26): 2193-2202.

**(Czech 2003)** Czech, M P. 2000. PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell* 100, no. 6 (Mars 17): 603-606.

**(Cooper et al. 2003)** Czech, Michael P. 2003. Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annual Review of Physiology* 65: 791-815.

**(Darnell et al. 1999)** Darnell, James E., Harvey Lodish, Arnold Berk, Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, et David Baltimore. 1999. *Molecular Cell Biology 4th ed*. 4 éd. W.H.Freeman & Co Ltd, Décembre 1.

**(Defacque et al. 2000)** Defacque, H, M Egeberg, A Habermann, M Diakonova, C Roy, P Mangeat, W Voelter, et al. 2000. Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *The EMBO Journal* 19, no. 2 (Janvier 17): 199-212.

**(Delatour et al. 2008)** Delatour, Vincent, Emmanuèle Helfer, Dominique Didry, Kim Hô Diêp Lê, Jean-François Gaucher, Marie-France Carlier, et Guillaume Romet-

Lemonne. 2008. Arp2/3 controls the motile behavior of N-WASP-functionalized GUVs and modulates N-WASP surface distribution by mediating transient links with actin filaments. *Biophysical Journal* 94, no. 12 (Juin): 4890-4905.

**(Denisov et al. 1998)** Denisov, G, S Wanaski, P Luan, M Glaser, et S McLaughlin. 1998. Binding of basic peptides to membranes produces lateral domains enriched in the acidic lipids phosphatidylserine and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: an electrostatic model and experimental results. *Biophysical Journal* 74, no. 2 Pt 1 (Février): 731-744.

**(Di Paolo et De Camilli 2006)** Di Paolo, Gilbert, et Pietro De Camilli. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, no. 7112 (Octobre 12): 651-657.

**(Doi et al. 1999)** Doi, Y, M Itoh, S Yonemura, S Ishihara, H Takano, T Noda, et S Tsukita. 1999. Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 4 (Janvier 22): 2315-2321.

**(Dugina et al. 2008)** Dugina, V B, T A Chipysheva, V D Ermilova, D Gabbiani, C Chaponnier, et Iu M Vasil'ev. 2008. [Distribution of actin isoforms in normal, dysplastic, and tumorous human breast cells]. *Arkhiv Patologii* 70, no. 2 (Avril): 28-31.

**(Dugina et al. 2009)** Dugina, Vera, Ingrid Zwaenepoel, Giulio Gabbiani, Sophie Clément, et Christine Chaponnier. 2009. {beta}- and {gamma}-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *Journal of Cell Science* 122, no. Pt 16 (Août 15): 2980-2988..

**(Fernandes et al. 2006)** Fernandes, Fábio, Luís M S Loura, Alexander Fedorov, et Manuel Prieto. 2006. Absence of clustering of phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate in fluid phosphatidylcholine. *Journal of Lipid Research* 47, no. 7 (Juillet): 1521-1525.

**(Fievet et al. 2004)** Fievet, Bruno T, Alexis Gautreau, Christian Roy, Laurence Del Maestro, Paul Mangeat, Daniel Louvard, et Monique Arpin. 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *The Journal of Cell Biology* 164, no. 5 (Mars 1): 653-659.

**(Franck et al. 1993)** Franck, Z, R Gary, et A Bretscher. 1993. Moesin, like ezrin, colocalizes with actin in the cortical cytoskeleton in cultured cells, but its expression is more variable. *Journal of Cell Science* 105 ( Pt 1) (Mai): 219-231.

**(Gambhir et al. 2004)** Gambhir, Alok, Gyöngyi Hangyás-Mihályné, Irina Zaitseva, David S Cafiso, Jiyao Wang, Diana Murray, Srinivas N Pentyala, Steven O Smith, et Stuart McLaughlin. 2004. Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophysical Journal* 86, no. 4 (Avril): 2188-2207.

**(Gary et al. 1995)** Gary, R, et A Bretscher. 1995. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Molecular Biology of the Cell* 6, no. 8 (Août): 1061-1075.

**(Gautreau et al. 2000)** Gautreau, A, D Louvard, et M Arpin. 2000. Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. *The Journal of Cell Biology* 150, no. 1 (Juillet 10): 193-203.

**(Gokhale et al. 2005)** Gokhale, Nikhil A, Alexandra Abraham, Michelle A Digman, Enrico Gratton, et Wonhwa Cho. 2005. Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *The Journal of Biological Chemistry* 280, no. 52 (Décembre 30): 42831-42840.

**(Golebiewska et al. 2006)** Golebiewska, Urszula, Alok Gambhir, Gyöngyi Hangyás-Mihályné, Irina Zaitseva, Joachim Rädler, et Stuart McLaughlin. 2006. Membrane-bound basic peptides sequester multivalent (PIP2), but not monovalent (PS), acidic lipids. *Biophysical Journal* 91, no. 2 (Juillet 15): 588-599.

**(Goldsmidt-Clermont et al. 1990)** Goldschmidt-Clermont, P J, L M Machesky, J J Baldassare, et T D Pollard. 1990. The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science (New York, N.Y.)* 247, no. 4950 (Mars 30): 1575-1578.

**(Gusella et al. 1996)** Gusella, J F, V Ramesh, M MacCollin, et L B Jacoby. 1996. Neurofibromatosis 2: loss of merlin's protective spell. *Current Opinion in Genetics & Development* 6, no. 1 (Février): 87-92.

**(Hama et al. 1999)** Hama, H, E A Schnieders, J Thorner, J Y Takemoto, et D B DeWald. 1999. Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 48 (Novembre 26): 34294-34300.

**(Hamada et al. 2000)** Hamada, K, T Shimizu, T Matsui, S Tsukita, et T Hakoshima. 2000. Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *The EMBO Journal* 19, no. 17 (Septembre 1): 4449-4462. doi:10.1093/emboj/19.17.4449.

**(Herman 1993)** Herman, I M. 1993. Actin isoforms. *Current Opinion in Cell Biology* 5, no. 1 (Février): 48-55.

**(Herrig et al. 2006)** Herrig, Alexander, Matthias Janke, Judith Austermann, Volker Gerke, Andreas Janshoff, et Claudia Steinem. 2006. Cooperative adsorption of ezrin on PIP2-containing membranes. *Biochemistry* 45, no. 43 (Octobre 31): 13025-13034.

**(Heuving et al. 2007)** Heuvingh, Julien, Michel Franco, Philippe Chavrier, et Cécile Sykes. 2007. ARF1-mediated actin polymerization produces movement of artificial vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, no. 43 (Octobre 23): 16928-16933.

**(Hieda et al. 1989)** Hieda, Y, S Tsukita, et S Tsukita. 1989. A new high molecular mass protein showing unique localization in desmosomal plaque. *The Journal of Cell Biology* 109, no. 4 Pt 1 (Octobre): 1511-1518.

**(Higgs et al. 2000)** Higgs, H N, et T D Pollard. 2000. Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *The Journal of Cell Biology* 150, no. 6 (Septembre 18): 1311-1320.

**(Higelmann 2007)** Higemann, Donald W. 2007. Local PIP(2) signals: when, where, and how? *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 455, no. 1 (Octobre): 55-67.

**(Hirao et al. 1996)** Hirao, M, N Sato, T Kondo, S Yonemura, M Monden, T Sasaki, Y Takai, S Tsukita, et S Tsukita. 1996. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *The Journal of Cell Biology* 135, no. 1 (Octobre): 37-51.

**(Hokanson et al. 2006)** Hokanson, David E, et E Michael Ostap. 2006. Myo1c binds tightly and specifically to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, no. 9 (Février 28): 3118-3123.

**(Huang et al. 1991)** Huang, F L, et K P Huang. 1991. Interaction of protein kinase C isozymes with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* 266, no. 14 (Mai 15): 8727-8733.

**(Hunter et al. 2004)** Hunter, Kent W. 2004. Ezrin, a key component in tumor metastasis. *Trends in Molecular Medicine* 10, no. 5 (Mai): 201-204.

**(Ilani et al. 2004)** Ilani, Tal, Chand Khanna, Ming Zhou, Timothy D Veenstra, et Anthony Bretscher. 2007. Immune synapse formation requires ZAP-70 recruitment by ezrin and

CD43 removal by moesin. *The Journal of Cell Biology* 179, no. 4 (Novembre 19): 733-746.

**(Isenberg et al. 1998)** Isenberg, G, et W H Goldmann. 1998. Peptide-specific antibodies localize the major lipid binding sites of talin dimers to oppositely arranged N-terminal 47 kDa subdomains. *FEBS Letters* 426, no. 2 (Avril 17): 165-170.

**(Isenberg et al. 1996)** Isenberg, G, V Niggli, U Pieper, S Kaufmann, et W H Goldmann. 1996. Probing phosphatidylinositolphosphates and adenosinenucleotides on talin nucleated actin polymerization. *FEBS Letters* 397, no. 2-3 (Novembre 18): 316-320.

**(Israelachvili 1991)** Israelachvili, Jacob N. 1991. *Intermolecular and Surface Forces*. 2 éd. Academic Press Inc, Novembre 8.

**(Janke et al. 2008)** Janke, Matthias, Alexander Herrig, Judith Austermann, Volker Gerke, Claudia Steinem, et Andreas Janshoff. 2008. Actin binding of ezrin is activated by specific recognition of PIP2-functionalized lipid bilayers. *Biochemistry* 47, no. 12 (Mars 25): 3762-3769.

**(Janmey et al. 2004)** Janmey, Paul A, et Uno Lindberg. 2004. Cytoskeletal regulation: rich in lipids. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5, no. 8 (Août): 658-666.

**(Kakorin et al. 2005)** Kakorin, Sergej, Ute Brinkmann, et Eberhard Neumann. 2005. Cholesterol reduces membrane electroporation and electric deformation of small bilayer vesicles. *Biophysical Chemistry* 117, no. 2 (Septembre 1): 155-171.

**(Kikuchi et al. 2002)** Kikuchi, Shojiro, Masaki Hata, Kanehisa Fukumoto, Yukari Yamane, Takeshi Matsui, Atsushi Tamura, Shigenobu Yonemura, et al. 2002. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nature Genetics* 31, no. 3 (Juillet): 320-325.

**(Kitajiri et al. 2004)** Kitajiri, Shin-ichiro, Kanehisa Fukumoto, Masaki Hata, Hiroyuki Sasaki, Tatsuya Katsuno, Takayuki Nakagawa, Juichi Ito, Shoichiro Tsukita, et Sachiko Tsukita. 2004. Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. *The Journal of Cell Biology* 166, no. 4 (Août 16): 559-570.

**(Kitano et al. 2006)** Kitano, Ken, Fumie Yusa, et Toshio Hakoshima. 2006. Structure of dimerized radixin FERM domain suggests a novel masking motif in C-terminal residues 295-304. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* 62, no. Pt 4 (Avril 1): 340-345.

**(Krishnan et al. 2009)** Krishnan, Kannan, Oliver Holub, Enrico Gratton, Andrew H A Clayton, Stephen Cody, et Pierre D J Moens. 2009. Profilin interaction with

phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate destabilizes the membrane of giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal* 96, no. 12 (Juin 17): 5112-5121.

**(Lee et al. 2003)** Lee, Eui-Nam, Sun-Young Lee, Daekyun Lee, Jongsun Kim, et Seung R Paik. 2003. Lipid interaction of alpha-synuclein during the metal-catalyzed oxidation in the presence of Cu2+ and H2O2. *Journal of Neurochemistry* 84, no. 5 (Mars): 1128-1142.

**(Legg et al. 2002)** Legg, James W, Charlotte A Lewis, Maddy Parsons, Tony Ng, et Clare M Isacke. 2002. A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nature Cell Biology* 4, no. 6 (Juin): 399-407.

**(Leterrier 1997)** Leterrier. 1997. *Biologie membranaire. Structure et dynamique des membranes biologiques*. Hermann, Octobre 21.

**(Levental et al. 2008)** Levental, Ilya, Andrejs Cebers, et Paul A Janmey. 2008. Combined electrostatics and hydrogen bonding determine intermolecular interactions between polyphosphoinositides. *Journal of the American Chemical Society* 130, no. 28 (Juillet 16): 9025-9030.

**(Levental et al. 2009)** Levental, Ilya, David A Christian, Yu-Hsiu Wang, Jonathan J. Madara, Dennis E. Discher, et Paul A. Janmey. 2009. Calcium-dependent lateral organization in phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP2)- and cholesterol-containing monolayers. *Biochemistry* (Juillet 24).

**(Lewis et al. 2005)** Lewis, Edwin A, et Kenneth P Murphy. 2005. Isothermal titration calorimetry. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.) 305: 1-16. doi:10.1385/1-59259-912-5:001.

**(Li et al. 2007)** Li, Qianzhi, Mark R Nance, Rima Kulikauskas, Kevin Nyberg, Richard Fehon, P Andrew Karplus, Anthony Bretscher, et John J G Tesmer. 2007. Self-masking in an intact ERM-merlin protein: an active role for the central alpha-helical domain. Journal of Molecular Biology 365, no. 5 (Février 2): 1446-1459.

**(Limozin et al. 2005)** Limozin, Laurent, Alexander Roth, et Erich Sackmann. 2005. Microviscoelastic moduli of biomimetic cell envelopes. *Physical Review Letters* 95, no. 17 (Octobre 21): 178101.

**(Lipowsky et Sackmann 1995)** Lipowsky, R., et E. Sackmann. 1995. *Structure and Dynamics of Membranes/Vol 1, Parts A & B*. Elsevier Science Ltd, Juin 15.

**(Liu et al. 2006)** Liu, Allen P, et Daniel A Fletcher. 2006. Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. *Biophysical Journal* 91, no. 11 (Décembre 1): 4064-4070.

**(Liu et al. 2007)** Liu, Dan, Ling Ge, Fengsong Wang, Hirohide Takahashi, Dongmei Wang, Zhen Guo, Shige H Yoshimura, et al. 2007. Single-molecule detection of phosphorylation-induced plasticity changes during ezrin activation. FEBS Letters 581, no. 18 (Juillet 24): 3563-3571.

**(Louvet-Vallée 2000)** Louvet-Vallée, S. 2000. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 92, no. 5 (Août): 305-316.

**(Machesky et al. 1994)** Machesky, L M, S J Atkinson, C Ampe, J Vandekerckhove, et T D Pollard. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *The Journal of Cell Biology* 127, no. 1 (Octobre): 107-115.

**(Malm et al. 1983)** Malm, B, H Larsson, et U Lindberg. 1983. The profilin--actin complex: further characterization of profilin and studies on the stability of the complex. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 4, no. 5 (Octobre): 569-588.

**(Matsui et al. 1998)** Matsui, T, M Maeda, Y Doi, S Yonemura, M Amano, K Kaibuchi, S Tsukita, et S Tsukita. 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *The Journal of Cell Biology* 140, no. 3 (Février 9): 647-657.

**(Mazzotti et al. 1995)** Mazzotti, G, N Zini, E Rizzi, R Rizzoli, A Galanzi, A Ognibene, S Santi, A Matteucci, A M Martelli, et N M Maraldi. 1995. Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate localization sites within the nucleus. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 43, no. 2 (Février): 181-191.

**(McClatchey et al. 1997)** McClatchey, A I, I Saotome, V Ramesh, J F Gusella, et T Jacks. 1997. The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. *Genes & Development* 11, no. 10 (Mai 15): 1253-1265.

**(McClatchey et al. 2003)** McClatchey, Andrea I. 2003. Merlin and ERM proteins: unappreciated roles in cancer development? *Nature Reviews. Cancer* 3, no. 11 (Novembre): 877-883.

**(McLaughlin et al. 2002)** McLaughlin, Stuart, Jiyao Wang, Alok Gambhir, et Diana Murray. 2002. PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 31: 151-175.

**(Mitchell et al. 2006)** Michell, Robert H, Victoria L Heath, Mark A Lemmon, et Stephen K Dove. 2006. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends in Biochemical Sciences* 31, no. 1 (Janvier): 52-63.

**(Moens et al. 2007)** Moens, Pierre D J, et Luis A Bagatolli. 2007. Profilin binding to sub-micellar concentrations of phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate and phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1768, no. 3 (Mars): 439-449.

**(Mori et al. 2008)** Mori, Tomoyuki, Ken Kitano, Shin-ichi Terawaki, Ryoko Maesaki, Yayoi Fukami, et Toshio Hakoshima. 2008. Structural basis for CD44 recognition by ERM proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 283, no. 43 (Octobre 24): 29602-29612.

**(Morrison et al. 1985)** Morrison, Ian D, E. F Grabowski, et C. A Herb. 1985. Improved techniques for particle size determination by quasi-elastic light scattering. Langmuir 1, no. 4: 496-501.

**(Nakamura et al. 1999)** Nakamura, F, L Huang, K Pestonjamasp, E J Luna, et H Furthmayr. 1999. Regulation of F-actin binding to platelet moesin in vitro by both phosphorylation of threonine 558 and polyphosphatidylinositides. Molecular Biology of the Cell 10, no. 8 (Août): 2669-2685.

**(Niggli et al. 1993)** Niggli, V. 1993. Lipid-cytoskeleton interactions. *Nature* 361, no. 6409 (Janvier 21): 214.

**(Niggli et al. 1995)** Niggli, V, C Andréoli, C Roy, et P Mangeat. 1995. Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Letters* 376, no. 3 (Décembre 4): 172-176.

**(Niggli et al. 2008)** Niggli, Verena, et Jérémie Rossy. 2008. Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40, no. 3: 344-349.

**(Ohvo-Rekila et al. 2002)** Ohvo-Rekilä, Henna, Bodil Ramstedt, Petra Leppimäki, et J Peter Slotte. 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Progress in Lipid Research* 41, no. 1 (Janvier): 66-97.

**(Ottenbein et al. 2001)** Otterbein, L R, P Graceffa, et R Dominguez. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. *Science (New York, N.Y.)* 293, no. 5530 (Juillet 27): 708-711.

**(Palmer 1981)** Palmer, F B. 1981. The phosphatidyl-myo-inositol-4,5-biphosphate phosphatase from Crithidia fasciculata. *Canadian Journal of Biochemistry* 59, no. 7 (Juillet): 469-476.

**(Pantaloni et al. 1993)** Pantaloni, D, et M F Carlier. 1993. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. Cell 75, no. 5 (Décembre 3): 1007-1014.

**(Pantaloni et al. 2001)** Pantaloni, D, C Le Clainche, et M F Carlier. 2001. Mechanism of actin-based motility. Science (New York, N.Y.) 292, no. 5521 (Mai 25): 1502-1506.

**(Pautot et al. 2003)** Pautot, Sophie, Barbara J Frisken, et D A Weitz. 2003. Engineering asymmetric vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 19 (Septembre 16): 10718-10721.

**(Pawley 2006)** Pawley, James B. 2006. Handbook of biological confocal microscopy. Springer.

**(Payrastre et al. 2001)** Payrastre, B, K Missy, S Giuriato, S Bodin, M Plantavid, et M Gratacap. 2001. Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *Cellular Signalling* 13, no. 6 (Juin): 377-387.

**(Pearson et al. 2000)** Pearson, M A, D Reczek, A Bretscher, et P A Karplus. 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* 101, no. 3 (Avril 28): 259-270.

**(Pecora 1985)** Pecora, Robert. 1985. Dynamic light scattering. Springer.

**(Pielak et al. 2001)** Pielak, G J, et X Wang. 2001. Interactions between yeast iso-1-cytochrome c and its peroxidase. Biochemistry 40, no. 2 (Janvier 16): 422-428.

**(Pollard 1986)** Pollard, T D. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *The Journal of Cell Biology* 103, no. 6 Pt 2 (Décembre): 2747-2754.

**(Pollard et al. 2001)** ollard, T D, L Blanchoin, et R D Mullins. 2001. Actin dynamics. *Journal of Cell Science* 114, no. Pt 1 (Janvier): 3-4.

**(Pollard et al. 2003)** Pollard, Thomas D, et Gary G Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, no. 4 (Février 21): 453-465.

**(Provencher 1982)** Provencher, Stephen W. 1982. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. Computer Physics Communications 27, no. 3 (Septembre): 229-242.

**(Pruyne et al. 2002)** Pruyne, David, Marie Evangelista, Changsong Yang, Erfei Bi, Sally Zigmond, Anthony Bretscher, et Charles Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science (New York, N.Y.)* 297, no. 5581 (Juillet 26): 612-615.

**(Quinlan et al. 2005)** Quinlan, Margot E, John E Heuser, Eugen Kerkhoff, et R Dyche Mullins. 2005. Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* 433, no. 7024 (Janvier 27): 382-388.

**(Rameh et al. 1997)** Rameh, L E, K F Tolias, B C Duckworth, et L C Cantley. 1997. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nature* 390, no. 6656 (Novembre 13): 192-196.

**(Redfern et al. 2005)** Redfern, Duane A, et Arne Gericke. 2005. pH-dependent domain formation in phosphatidylinositol polyphosphate/phosphatidylcholine mixed vesicles. *Journal of Lipid Research* 46, no. 3 (Mars): 504-515.

**(Riske et al. 2005)** Riske, Karin A, et Rumiana Dimova. 2005. Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. Biophysical Journal 88, no. 2 (Février): 1143-1155.

**(Riske et al. 2006)** Riske, Karin et Rumiana Dimova. 2006. Electric pulses induce cylindrical deformations on giant vesicles in salt solutions. Biophysical Journal 91, no. 5 (Septembre 1): 1778-1786.

**(Rodriguez et al. 2005)** Rodriguez, Nicolas, Frédéric Pincet, et Sophie Cribier. 2005. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces* 42, no. 2 (Mai 10): 125-130.

**(Roland et al. 2008)** Roland, Jeremy, Julien Berro, Alphée Michelot, Laurent Blanchoin, et Jean-Louis Martiel. 2008. Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophysical Journal* 94, no. 6 (Mars 15): 2082-2094.

**(Römer et al. 2007)** Römer, Winfried, Ludwig Berland, Valérie Chambon, Katharina Gaus, Barbara Windschiegl, Danièle Tenza, Mohamed R E Aly, et al. 2007. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 450, no. 7170 (Novembre 29): 670-675.

**(Roy et al. 1997)** Roy, C, M Martin, et P Mangeat. 1997. A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding. *The Journal of Biological Chemistry* 272, no. 32 (Août 8): 20088-20095.

**(Saleh et al. 2009)** Saleh, Henri S, Ulrike Merkel, Katja J Geissler, Tobias Sperka, Antonio Sechi, Constanze Breithaupt, et Helen Morrison. 2009. Properties of an ezrin mutant defective in F-actin binding. *Journal of Molecular Biology* 385, no. 4 (Janvier 30): 1015-1031.

**(Saad et al. 2006)** Saad, Jamil S, Jaime Miller, Janet Tai, Andrew Kim, Ruba H Ghanam, et Michael F Summers. 2006. Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, no. 30 (Juillet 25): 11364-11369.

**(Sandre 2000)** Sandre, Olivier. 2000. Pores transitoires, adhésion et fusion de vésicules géantes. University Paris 6.

**(Saotome et al. 2004)** Saotome, Ichiko, Marcello Curto, et Andrea I McClatchey. 2004. Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine. *Developmental Cell* 6, no. 6 (Juin): 855-864.

**(Sato et al. 1991)** Sato, N, S Yonemura, T Obinata, S Tsukita, et S Tsukita. 1991. Radixin, a barbed end-capping actin-modulating protein, is concentrated at the cleavage furrow during cytokinesis. *The Journal of Cell Biology* 113, no. 2 (Avril): 321-330.

**(Schaffer et al. 1995)** Schafer, D A, et J A Cooper. 1995. Control of actin assembly at filament ends. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11: 497-518.

**(Sciorra et al. 2002)** Sciorra, Vicki A, Simon A Rudge, Jiyao Wang, Stuart McLaughlin, JoAnne Engebrecht, et Andrew J Morris. 2002. Dual role for phosphoinositides in regulation of yeast and mammalian phospholipase D enzymes. *The Journal of Cell Biology* 159, no. 6 (Décembre 23): 1039-1049.

**(Scoles et al. 1998)** Scoles, D R, D P Huynh, P A Morcos, E R Coulsell, N G Robinson, F Tamanoi, et S M Pulst. 1998. Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with betaII-spectrin. *Nature Genetics* 18, no. 4 (Avril): 354-359.

**(Shaffer et al. 2009)** Shaffer, Meredith H, Renell S Dupree, Peimin Zhu, Ichiko Saotome, Richard F Schmidt, Andrea I McClatchey, Bruce D Freedman, et Janis K Burkhardt. 2009. Ezrin and moesin function together to promote T cell activation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182, no. 2 (Janvier 15): 1021-1032.

**(Shaw 2001)** Shaw, A S. 2001. FERMing up the synapse. *Immunity* 15, no. 5 (Novembre): 683-686.

**(Sheetz et al. 1995)** Sheets, E D, R Simson, et K Jacobson. 1995. New insights into membrane dynamics from the analysis of cell surface interactions by physical methods. *Current Opinion in Cell Biology* 7, no. 5 (Octobre): 707-714.

**(Siegert 1943)** Siegert, A. 1943. . MIT Lab reports, no. 465.

**(Simson et al. 1995)** Simson, R, E D Sheets, et K Jacobson. 1995. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis.

*Biophysical Journal* 69, no. 3 (Septembre): 989-993. doi:10.1016/S0006-3495(95)79972-6.

**(Singer et nicholson 1972)** Singer, S J, et G L Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)* 175, no. 23 (Février 18): 720-731.

**(Solon et al. 2005)** Solon, Jérôme, Olivier Gareil, Patricia Bassereau, et Yves Gaudin. 2005. Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system. *The Journal of General Virology* 86, no. Pt 12 (Décembre): 3357-3363.

**(Stachowiak et al. 2008)** Stachowiak, Jeanne C, David L Richmond, Thomas H Li, Allen P Liu, Sapun H Parekh, et Daniel A Fletcher. 2008. Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, no. 12 (Mars 25): 4697-4702.

**(Sugiura et al. 1981)** Sugiura, Y. 1981. Structure of molecular aggregates of 1-(3-sn-phosphatidyl)-L-myo-inositol 3,4-bis(phosphate) in water. *Biochimica Et Biophysica Acta* 641, no. 1 (Février 20): 148-159.

**(Suh et al. 2008)** Suh, Byung-Chang, et Bertil Hille. 2008. PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why? *Annual Review of Biophysics* 37: 175-195.

**(Sun et al. 2002)** Sun, Chun-Xiao, Victoria A Robb, et David H Gutmann. 2002. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *Journal of Cell Science* 115, no. Pt 21 (Novembre 1): 3991-4000.

**(Svitkina et al. 2003)** Svitkina, Tatyana M, Elena A Bulanova, Oleg Y Chaga, Danijela M Vignjevic, Shin-ichiro Kojima, Jury M Vasiliev, et Gary G Borisy. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *The Journal of Cell Biology* 160, no. 3 (Février 3): 409-421.

**(Takeda et al. 2006)** Takeda, Shuichi, Akihiko Saitoh, Mayumi Furuta, Nao Satomi, Atsushi Ishino, Gakushi Nishida, Hiroaki Sudo, Hirokazu Hotani, et Kingo Takiguchi. 2006. Opening of holes in liposomal membranes is induced by proteins possessing the FERM domain. *Journal of Molecular Biology* 362, no. 3 (Septembre 22): 403-413.

**(Toker 1998)** Toker, A. 1998. The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Current Opinion in Cell Biology* 10, no. 2 (Avril): 254-261.

**(Tomasevic et al. 2007)** Tomasevic, Nenad, Zhiheng Jia, Alan Russell, Toby Fujii, James J Hartman, Sheila Clancy, Manping Wang, Christophe Beraud, Kenneth W Wood, et

Roman Sakowicz. 2007. Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2. *Biochemistry* 46, no. 11 (Mars 20): 3494-3502.

**(Toner et al. 1988)** Toner, M, G Vaio, A McLaughlin, et S McLaughlin. 1988. Adsorption of cations to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 27, no. 19 (Septembre 20): 7435-7443.

**(Tong et al. 2008)** Tong, Jihong, Lam Nguyen, Adriana Vidal, Sidney A Simon, J H Pate Skene, et Thomas J McIntosh. 2008. Role of GAP-43 in sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to Raft bilayers. *Biophysical Journal* 94, no. 1 (Janvier 1): 125-133.

**(Tseng et al. 2005)** Tseng, Yiider, Thomas P Kole, Jerry S H Lee, Elena Fedorov, Steven C Almo, Benjamin W Schafer, et Denis Wirtz. 2005. How actin crosslinking and bundling proteins cooperate to generate an enhanced cell mechanical response. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, no. 1 (Août 19): 183-192.

**(Tsukita et al. 1999)** Tsukita, S, et S Yonemura. 1999. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 274, no. 49 (Décembre 3): 34507-34510.

**(Turunen et al. 1994)** Turunen, O, T Wahlström, et A Vaheri. 1994. Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *The Journal of Cell Biology* 126, no. 6 (Septembre): 1445-1453.

**(Valeur 2004)** Valeur, Bernard. 2004. Invitation à la fluorescence moléculaire. De Boeck Université.

**(Vereb et al. 2003)** Vereb, G, J Szöllosi, J Matkó, P Nagy, T Farkas, L Vigh, L Mátyus, T A Waldmann, et S Damjanovich. 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, no. 14 (Juillet 8): 8053-8058.

**(Verhoeven et al. 1987)** Verhoeven, A J, O B Tysnes, G M Aarbakke, C A Cook, et H Holmsen. 1987. Turnover of the phosphomonoester groups of polyphosphoinositol lipids in unstimulated human platelets. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 166, no. 1 (Juillet 1): 3-9.

**(Verhoeven et al. 1987)** Verhoeven, A J, O B Tysnes, O Horvli, C A Cook, et H Holmsen. 1987. Stimulation of phosphate uptake in human platelets by thrombin and collagen. Changes in specific 32P labeling of metabolic ATP and polyphosphoinositides. *The Journal of Biological Chemistry* 262, no. 15 (Mai 25): 7047-7052.

**(Walch-Solimena et al. 1999)** Walch-Solimena, C, et P Novick. 1999. The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nature Cell Biology* 1, no. 8 (Décembre): 523-525.

**(Wang et al. 2002)** Wang, Jiyao, Alok Gambhir, Gyöngyi Hangyás-Mihályné, Diana Murray, Urszula Golebiewska, et Stuart McLaughlin. 2002. Lateral sequestration of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by the basic effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate is due to nonspecific electrostatic interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 277, no. 37 (Septembre 13): 34401-34412.

**(Weber et al. 1992)** Weber, A, V T Nachmias, C R Pennise, M Pring, et D Safer. 1992. Interaction of thymosin beta 4 with muscle and platelet actin: implications for actin sequestration in resting platelets. Biochemistry 31, no. 27 (Juillet 14): 6179-6185.

**(White et al. 1987)** White, JG, et WB Amos. 1987. Confocal microscopy come to ages. NATURE 328, no. 6126 (Juillet 9): 183-184.

**(Yao et al. 1996)** Yao, X, L Cheng, et J G Forte. 1996. Biochemical characterization of ezrin-actin interaction. The Journal of Biological Chemistry 271, no. 12 (Mars 22): 7224-7229

**(Zernike et al. 1948)** ZERNIKE, F. 1948. Observing the phases of light waves. Science (New York, N.Y.) 107, no. 2784 (Mai 7): 463

**(Zhu et al. 2005)** Zhu, Lixin, Yuechueng Liu, et John G. Forte. 2005. Ezrin oligomers are the membrane-bound dormant form in gastric parietal cells. Am J Physiol Cell Physiol 288, no. 6 (Juin 1): C1242-1254.

**(Zimmermann et al. 2002)** Zimmermann, Pascale, Kris Meerschaert, Gunter Reekmans, Iris Leenaerts, J Victor Small, Joël Vandekerckhove, Guido David, et Jan Gettemans. 2002. PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Molecular Cell* 9, no. 6 (Juin): 1215-1225.

**RESUME**

**La membrane plasmique de la cellule est composée de lipides et interagit notamment avec le squelette de la cellule (le cytosquelette), par l'intermédiaire de protéines d'ancrages et de lipides clefs qui jouent un rôle spécifique dans certains types d'interactions.**

**Parmi les protéines intervenant dans l'ancrage direct de la membrane plasmique au cytosquelette, des protéines de la famille des ERM (Ezrine, Radixine, Moésine) peuvent interagir spécifiquement avec un lipide, le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP2), d'une part et avec l'actine du cytosquelette d'autre part. Dans le but de comprendre les interactions entre membrane plasmique et cytosquelette, nous avons réalisé des expériences in vitro sur des systèmes comportant un nombre minimal de constituants : des vésicules géantes (GUV) contenant du PIP2, de l'ezrine recombinante et de l'actine purifiée.**

**Nous avons mis en évidence que la liaison au PIP2 induit des changements conformationnels de l'ezrine. L'ezrine est alors capable d'interagir avec les filaments d'actine. Nous avons caractérisé quantitativement l'incorporation de PIP2 dans la membrane de vésicule géantes, et montré que l'interaction de l'ezrine avec les vésicule géante contenant du PIP2, induit un partitionnement du lipide dans la bicouche lipidique et conduit à la formation d'agrégats de PIP2 et d'ezrine sur la membrane. La connaissance des effets de l'ezrine sur les membranes contenant du PIP2 et la connaissance des différents mécanismes se produisant lors des interactions permettra de définir plus précisément le rôle de l'ezrine *in cellulo*.**

---

## Plasma membrane and cytoskeleton interaction : a biomimetic approach to study interactions between ezrin, PIP2 and actin

---

**ABSTRACT**

**The plasma membrane is composed of several different lipids and can interact directly with the actin cytoskeleton via specific lipids and linker proteins.**

**Among these is the ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) family of proteins, which is involved in the direct linkage of the membrane to the actin cytoskeleton via a phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP2) lipid binding site. Our aim is to understand the interactions between these proteins and PIP2 using in vitro simplifed biomimetic systems like giant unilamellar vesicles (GUV) containing PIP2.**

**We showed that a conformational change of ezrin occur when the protein binds to PIP2, this conformational change allowing ezrin to bind to actin filaments. We have characterized quantitatively the incorporation of PIP2 in the membrane of giant vesicles, and showed that the interaction of ezrin with GUV induce a partitioning of the lipid within the membrane as well as ezrin aggregates on the membrane. Likewise, ezrin oligomers were observed only in the presence of PIP2.**

**A better understanding of the interplay between ezrin, PIP2-containing membranes and actin will help to get a better view of the role of ezrin *in cellulo*.**

---

**DISCIPLINE**

**Physique – Biophysique – Biomimétisme – Biologie – Biologie moléculaire**

---

**MOTS-CLES**

**Membrane plasmique, cytosquelette, ezrine, actine, phosphatidylinositol(4,5)biphosphate (PIP2), microscopie confocale, microscopie à onde évanescente (TIRF), potentiel zêta, vésicules géantes, oligomérisation.**

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :**

**Laboratoire des colloïdes verres et nanomatériaux (LCVN)- UMR 5587 CNRS-UM2 Université Montpellier II place Eugène Bataillon 34095 Montpellier Cedex 5 France**

**Laboratoire de Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques (DIMNP) – UMR 5235 CNRS-UM2. Université Montpellier II place Eugène Bataillon 34095 Montpellier Cedex 5 France**