HAL
open science

Cytosquelette d'actine et déformations membranaires : du liposome à la reconstruction cellulaire

Joel Lemiere

To cite this version:

Joel Lemiere. Cytosquelette d'actine et déformations membranaires : du liposome à la reconstruction cellulaire. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Diderot, 2014. Français. NNT : . tel-01151494

HAL Id: tel-01151494

https://u-paris.hal.science/tel-01151494v1

Submitted on 12 May 2015

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.

Copyright

UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - SORBONNE PARIS CITE

T H È S E

pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences

de l'Université PARIS DIDEROT (Paris 7)

Spécialité : Interface Physique-Biologie

Présentée et soutenue par

Joël Lemière

Cytosquelette d'actine et déformations membranaires : du liposome à la reconstruction cellulaire

Thèse dirigée par Cécile Sykes

préparée à l'Institut Curie

soutenue le 28 Avril 2014, devant le jury composé de :

Président :	René-Marc Mège	-	Université Paris Diderot
Rapporteurs :	Cendrine Moskalenko	-	ENS de Lyon
	Aurélien Roux	-	Université de Genève
Examinateurs :	Guillaume Charras	-	University College London
	Raphaël Voituriez	-	Université Pierre et Marie Curie
Directrice :	Cécile Sykes	-	Institut Curie - UPMC

Remerciements

Il s'agit là des dernières pages écrites de ce manuscrit bien qu'elles soient aussi les premières à apparaître. Je les attendais depuis un bon moment mais la perspective de clôturer définitivement le chapitre de Ma Thèse est assez angoissante, c'est la fin de mes études et le début de ma carrière en tant que scientifique après tout !

Mon arrivée dans l'équipe de Cécile Sykes est en grande partie une histoire de chance. Certes durant mon enfance et plus particulièrement durant mon Master de biophysique j'avais entendu parler de l'Institut Curie mais je n'avais pas planifié de m'y retrouver pour mon doctorat. Heureusement que le hasard fait bien les choses quelques fois. Cécile a su m'accueillir dans son équipe, me donner le temps de m'adapter. J'ai découvert une personne humainement formidable qui m'a transmis énormément. Cécile, tu m'as donné suffisamment de liberté pour me laisser mettre en œuvre les idées qui trottaient sans cesse dans ma tête, tout en me dirigeant ou en me re-cadrant quand c'était nécessaire, sans que j'en sois frustré pour autant. Ceux qui me connaissent et qui savent à quel point je ne supporte pas de ne pas finir ce que j'ai décidé de commencer vous dirons que c'est un petit miracle. A aucun moment je ne me suis senti ridiculisé ou rabaissé en ta présence, bien au contraire tu as une bienveillance envers les membres de ton équipe que j'admire énormément et qui est selon moi la clef d'une équipe soudée qui fonctionne en collaborant, loin de ce que j'ai pu croiser avant d'arriver dans ton laboratoire.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse pour leur regard critique et leurs questions, toujours dans le but d'améliorer le manuscrit. Je remercie plus particulièrement mes deux rapporteurs, Cendrine Moskalenko qui m'a suivi —et j'espère vue évoluer !— depuis mon entrée à l'ENS Lyon et Aurélien Roux, la première personne à m'avoir posé des questions sur mon sujet de thèse lors de ma première école d'été à Porquerolles. A vous deux, vous formez un excellent binôme de rapporteurs que je suis fier d'avoir eu. Merci aussi à René-Marc Mège d'avoir bien voulu présider mon jury et enfin merci à Raphaël Voituriez et à Guillaume Charras d'avoir accepté le rôle d'examinateurs.

Merci à mes deux tuteurs de thèse, Ludger Johannes et Cendrine Moskalenko qui ont pris sur leur temps pour suivre mes travaux régulièrement, vérifier que je ne m'égarais pas trop, qui m'ont aidé à prendre des décisions sur les pistes à approfondir et celles que l'on doit laisser parce que, même avec toute la bonne volonté du monde, on ne peut pas tout faire. Un dernier petit mot pour Cendrine et son sourire, qui en plus d'avoir accepté le rôle de tuteur durant ma thèse a largement contribué à me faire découvrir et apprécier la biophysique, grâce aux cours d'introduction dispensés en Licence, et lorsqu'en M1 tu m'as orienté vers Jean-Claude Vial pour effectuer mon

stage de recherche.

Je me dois aussi de remercier les deux organismes qui ont financé ma thèse, d'abord les Fonds AXA pour la recherche, qui m'ont soutenu durant 3 années et la fondation ARC pour une durée de 6 mois. En plus de permettre le financement des thèses ces deux organismes proposent des journées rencontres entre les jeunes doctorants et des chercheurs permanents ou des donateurs qui nous rappellent à travers leurs réussites ou leur histoires personnelles pour quoi on fait ce travail.

Durant ma thèse j'ai pu bénéficier du soutien et des conseils scientifiques de nombreuses personnes. Je remercie Pierre Nassoy et Patricia Bassereau pour m'avoir laissé faire des expériences de tirage de tubes notamment, Thomas Risler pour les pauses thés et discussions sur les contraintes d'un gel d'actine en milieu confiné, John Manzi et Fahima Faquir pour l'initiation à la purification de protéines, Rémy Fert et Benoît Lemaire sans qui le microscope ne serait jamais devenu une oeuvre d'art, et enfin Brigitte Dasilva, Karen Brémond, Laurence Turpin et Agnes Verin pour le soutien administratif.

Mon travail de thèse ne s'est pas fait seul, il est le résultat de nombreuses heures d'apprentissage, d'expériences, de discussions. Je tiens à remercier Timo Betz qui m'a permis de mettre les mains dans un montage d'optique afin de le modifier à ma sauce, et qui s'est chargé de toute l'interface Labview qui a tendance à me donner des boutons. Merci aussi à Julie Plastino qui est notre biologiste attitrée, toujours disponible pour répondre à mes questions sur les composants de la polymérisation de l'actine ou sur les Etats-Unis. L'équipe est aussi composée de post-doctorants à qui je dois beaucoup, les plus anciens m'ont accueilli et formé sur les techniques expérimentales nécessaires à mon travail, je pense à Karine, Clément, Florian et bien évidemment Kévin Carvalho, le maître incontesté de l'*in vitro* en ce qui me concerne, avec qui j'ai adoré travailler, discuter et aussi boire un verre en dehors du laboratoire. Et enfin les petits nouveaux, Matthias, tout d'abord, qui est arrivé quelques mois après moi, l'indispensable monsieur informatique, traitement lourd d'images, Python et compagnie sans qui je serais sûrement encore en train de me battre avec Matlab pour obtenir des données, dignes de ce nom. A mon tour j'ai accueilli le dernier venu en thèse, Fabrice, à qui je souhaite de passer autant de bons moments que moi à Curie auprès de Cécile et bien évidemment du microscope ! Je tiens aussi à remercier ceux qui m'ont soutenu par leur présence au sein du laboratoire (l'UMR 168 ou 144) avec qui j'ai interagi plus ou moins étroitement au sein du laboratoire ou dans un bar —après les heures de travail bien entendu— durant ces années de thèse : Svitlana, Wyley, Kasha, Rodrigo, François, Alice, Thomas, Édouard, Hervé, Morgan, Simon, Stéphanie. Et un spécial remerciement à Coline avec qui j'ai passé plusieurs weekend au sous-sol à tirer des tubes de membrane, pour m'avoir accueilli dans son petit bureau le temps que j'écrive ce manuscrit, j'espère t'avoir aussi un peu aidée et soutenue. Merci à

Henri-François, pour m'avoir présenté et proposé une collaboration sur l'endophiline que j'ai adoré ne serait-ce que pour le challenge que représentait l'expérience, mais aussi pour m'avoir motivé à reprendre la musique !

Merci aux amis de Grenoble, venus à Paris tout comme moi, d'avoir insisté plusieurs fois pour me faire sortir un peu de ma routine, je pense notamment à Harold, Marine, Lorrie et Benoît. Un énorme merci à mes amis lyonnais que j'adore tout simplement. Mylène, Juliette, Denis, Léo, Aurélia, Adriana, Isaac, Marine, Laurie, Miriam, Anne-Sophie, Anne-Florence, Nicolas,... je vous dois énormément. C'est grâce à vous que j'ai appris à prendre confiance en moi, à m'affirmer un peu plus chaque jour et à me libérer tout simplement. Il commence à se faire lointain le temps de nos premières collocations, des repas organisés dans le jardin de l'ENS ou sur le balcon de la résidence, malgré ça et la distance géographique on est resté un groupe d'amis soudés que j'adore voir et sur qui je peux compter. La réciproque étant aussi vraie évidemment.

Merci à Mylène pour les petites aquarelles envoyées par voie postale qui égayaient mon bureau de l'institut Curie et ma chambre parisienne, à la "Belz" Juliette pour avoir soutenu et supporté 4 années de collocation avec le "Buth" de Jojo que je suis dans les bons et les moins bon moments, à Miriam pour les pauses thé et gâteaux, à Sébastien pour les week-end évasions ainsi que les moments partagés et les bons souvenirs que j'en garderai —finalement Lille est une jolie ville—, à Julien et Aurélia pour les petites excursions Parisiennes leur bonne humeur et leurs sourires, à Jérémie d'être venu assister à la soutenance et d'avoir mis en place la visio-conférence pour Benoit cloué dans son lit à ce moment et le reste de la bande d'amis parisiens Moïra, Memmi, Yohan, Adrien, Marielle,...pour les soirées, les pique-niques et les moments jeux.

Je voulais avoir aussi un petit mot pour les professeurs que j'ai admiré étant élève ou étudiant, qui m'ont transmis leur passion pour l'enseignement, la physique, la chimie et la biologie. C'est aussi parce que j'ai croisé leur route que j'en suis arrivé là aujourd'hui. Quand je me retrouve à mon tour devant une classe c'est de vous que je m'inspire. Je pense à M. Perrin, mon enseignant de CM2 le premier à m'avoir fait confiance, à M. Long au collège et ses cours de biologie, à Mme. Zara au lycée et son "minute papillon" quand je posais trop de questions mais qui me donnait toujours une réponse satisfaisante pour me rassasier, à M. Monteillier en PC, qui nous offrait des cours de physique limpides dans lesquels il y mettait toute son énergie et qui m'a permis de rentrer dans l'école que je voulais —et non, je n'ai pas bifurqué en histoire comme vous en aviez peur !— je suis moi aussi devenu professeur agrégé de physique.

Je terminerai cette partie en remerciant ma famille et plus particulièrement mes deux parents : merci maman, merci papa. Je n'oublie pas ma soeurette —et sa relecture efficace même à l'autre bout du globe !— ainsi que mon grand père. Vous m'avez tous soutenu, chacun à votre manière, durant toutes ces années.

Table des matières

Introduction générale **1**

1 Organisation et mouvement cellulaire **3**

1.1 Le changement de forme cellulaire 3
1.2 La membrane cellulaire 9
1.3 Le cytosquelette d'actine 10
1.3.1 L'actine 12
1.3.2 La dynamique de polymérisation de l'actine *in vitro* 14
1.3.3 Les protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine 17
1.4 Les myosines 23
1.5 Conclusion 27

2 Les systèmes biomimétiques pour l'étude du cytosquelette d'actine **29**

2.1 Les systèmes biomimétiques à base de billes 31
2.1.1 La propulsion de *Listeria monocytogenes* 31
2.1.2 De *Listeria monocytogenes* à la bille 33
2.1.3 Caractérisation mécanique et biochimique de la brisure du cortex d'actine 35
2.1.4 La diversité des systèmes biomimétiques 36
2.2 Les liposomes 37
2.2.1 Les différents types de vésicules 39
2.2.2 Techniques de formation des GUVs 40
2.2.3 Le liposome utilisé comme milieu de réaction : les bioréacteurs . . 45
2.2.4 Le liposome "inversé", utilisé comme support de réaction 48
2.2.5 La physique des membranes 49
2.3 Conclusion 54

3 Caractérisation de l'incorporation de l'α-hémolysine à la surface d'un bioréacteur **55**

3.1 Mesure de la perte de contraste 56
3.1.1 Le montage expérimental 58
3.1.2 Mise en place de l'échantillon 60
3.2 Les résultats 60
3.3 Conclusion 66
3.4 Article 1 : α-hemolysin membrane pore density measured on liposomes 68

4 Transformation des tubules de Shiga par l'endophiline-A2 77
4.1 La famille des toxines de Shiga . . . 78
4.1.1 Structure de la toxine de Shiga . . . 79
4.1.2 Interaction avec les membranes . . . 79
4.1.3 Internalisation de la toxine de Shiga . . . 80
4.2 L'endophiline . . . 82
4.2.1 Les protéines à domaine BAR . . . 82
4.2.2 Structure . . . 83
4.3 Résultats . . . 85
4.3.1 Interaction de la toxine de Shiga avec une membrane modèle . . . 86
4.3.2 Interaction de l'endophiline-A2 avec une membrane modèle . . . 86
4.3.3 Effet de l'endophiline-A2 sur les tubulations de Shiga . . . 91
4.4 Conclusion . . . 94
4.5 Article 2 : Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis . . . 95

5 Etude de l'effet de la myosine II sur un cortex d'actine biomimétique 103
5.1 Formation d'un cortex d'actine sur liposome . . . 104
5.1.1 Polymérisation sur liposome . . . 104
5.1.2 Polymérisation en solution . . . 109
5.1.3 Le système biomimétique . . . 109
5.2 Les résultats . . . 112
5.2.1 La polymérisation de l'actine en présence de CP . . . 112
5.2.2 Dynamique de rétraction du cortex stabilisé d'actine par la myosine 114
5.2.3 Contraction d'un réseau dynamique d'actine par la myosine . . . 116
5.2.4 Dynamique de la tension de contraction sur un doublet de liposome 117
5.3 Conclusion . . . 124
5.4 Article 3 : Actin polymerization or myosin contraction : two ways to build up cortical tension for symmetry breaking . . . 125
5.5 Article 4 : Cell-sized liposome doublets reveal active cortical tension build up. . . . 135

6 Caractérisation de la dynamique de polymérisation de l'actine sur la force de maintien d'un tube de membrane lipidique 153
6.1 Présentation du montage expérimental . . . 154
6.2 Evolution de la force par ajout de la polymérisation de l'actine . . . 159
6.2.1 Caractérisation des membranes nues . . . 159
6.2.2 Injection de l'actine . . . 160
6.2.3 Polymérisation de l'actine . . . 163
6.2.4 Et si on retirait ? . . . 165
6.3 Expériences supplémentaires . . . 168

6.3.1 En présence de la toxine de Shiga 168
6.3.2 En présence de la myosine II 169
6.4 Conclusion 169

Conclusion générale **171**

Annexes **174**

A Contribution Article 5 **175**
A.1 Article 5 : Mechanical detection of a long range actin network emanating from a biomimetic cortex 175

B Les tampons **185**
B.1 Tampon G 185
B.2 Les Tampons liés à la polymérisation de l'actine 185
B.2.1 Polymérisation sur un liposome 185
B.2.2 Polymérisation sur un tube de membrane 186
B.2.3 Polymérisation en masse, TPM 186
B.3 Tampon de l'α-hémolysine 187
B.4 Tampon de dialyse des myosines II, l'AB300 187
B.5 Tampon Shiga Toxine 187
B.6 Tampon Endophiline A2 188

C Test de motilité des myosines **189**

D Polymérisation d'actine **191**
D.1 Polymérisation en solution 191
D.2 Polymérisation sur liposomes 191
D.3 Polymérisation sur billes 191
D.4 Polymérisation d'actine biotinylée 192

E Formation des liposomes **193**
E.1 Electroformation 193
E.2 Emulsion inverse 194
E.3 Liposome à membrane asymétrique 195

Bibliographie **197**

Introduction générale

Les cellules sont capables de se déplacer au sein de leur environnement, c'est ce que l'on appelle la migration cellulaire. Il s'agit d'un phénomène qui intervient dans des processus physiologiques fondamentaux. En effet, la migration permet d'organiser les tissus et les organes durant l'embryogenèse. Elle permet aux cellules de notre système immunitaire, les neutrophiles, de traverser la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins afin qu'ils se dirigent vers les lieux d'infections et recherche activement la présence de pathogènes. Lors de la cicatrisation, les fibroblastes, des cellules spécialisées dans la réparation du tissu, vont migrer au niveau de la lésion de manière à coloniser et réparer la plaie.

Ces mouvements cellulaires sont dirigés par le squelette de la cellule (cytosquelette) et toute une machinerie cellulaire qui s'organisent de façon à définir un axe de polarité de la cellule et un sens de déplacement. Le cytosquelette est un réseau de filaments dynamiques et contrôlés par de nombreuses protéines. C'est lui qui, en plus d'être à l'origine du mouvement, confère sa forme et ses propriétés mécaniques à la cellule.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis principalement intéressé au rôle particulier de l'actine et de la myosine, deux protéines du cytosquelette, dans la déformation membranaire. Cette étude consiste à reconstruire *in vitro* et à caractériser l'effet de ces composants, indépendamment l'un de l'autre. L'approche utilisant des systèmes épurés a déjà permis de reconstruire des fonctions cellulaires en milieux confinés ; une partie de mes travaux de thèse caractérise ces systèmes. Je présente rapidement l'ensemble des chapitres composant ce manuscrit :

- **Les chapitres 1 & 2** servent à introduire toutes les notions essentielles à ma thèse. Je commence par présenter la biochimie du mouvement cellulaire et plus particulièrement les protéines liées à la dynamique de polymérisation de l'actine, un constituant essentiel du squelette cellulaire. Dans un second temps j'introduis l'origine des modèles *in vitro* à travers l'étude du mouvement d'une bactérie, la *Listeria*. Je présente ensuite l'évolution et la diversité de ces systèmes capables de mimer le vivant et qui permettent de décortiquer les mécanismes à la base du mouvement cellulaire.

- **Le chapitre 3** porte sur la quantification de l'incorporation d'un pore, l'α-hémolysine, dans les membranes de liposomes ainsi que sur la caractérisation de la diffusion de sucres au travers de ce pore passif. Grâce à des mesures dynamiques de variation d'indice optique, cette étude montre aussi que la densité surfacique

de pores dépend de la composition lipidique des membranes.

- **Le chapitre 4** porte sur l'étude *in vitro* de l'endophiline-A2 dans les mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine. Ces mécanismes sont mis en évidence par la toxine de Shiga. Pour cette étude, nous avons formé, par émulsion inverse, des liposomes asymétriques afin de reproduire, de part et d'autre de la membrane, les interactions spécifiques de l'endophiline-A2 et de la toxine. Cette étude a permis de mettre en évidence le rôle de l'endophiline-A2, qui seule n'induit aucune déformation membranaire mais qui est capable de stabiliser des déformations pré-existantes créées par la toxine de Shiga. Ces travaux ont été menés en collaboration avec l'équipe de Ludger Johannes (UMR 144, Institut Curie).

- **Le chapitre 5** approfondit le rôle de la myosine II sur la contraction et le changement de forme cellulaire. Dans cette étude nous avons reproduit, à la surface externe d'un liposome, une contraction d'acto-myosine en découplant l'effet de la polymérisation de l'actine, de l'effet des myosines, sur la création des contraintes mécaniques. Dans un deuxième temps, nous avons aussi mis au point un nouveau système biomimétique, à base de liposomes, afin de pouvoir quantifier de manière dynamique les forces et les déformations engendrées par la myosine.

- **Le chapitre 6** porte sur l'étude des tubes de membrane et leur changement de propriétés mécaniques lorsqu'un réseau d'actine croît à leur surface. Le montage mis au point pour la suite de cette étude est tout d'abord présenté, puis l'on expose quelques résultats préliminaires principalement basés sur la stabilisation ou la scission des tubes de membrane. Les premières expériences de ce chapitre ont été effectuées à l'aide d'un montage expérimental de l'équipe de Patricia Bassereau (UMR 168, Institut Curie).

Chaque chapitre s'ouvre sur une brève introduction et présente, de manière plus détaillée, les éléments qui lui sont spécifiques. Cette partie est suivie des principaux résultats et lorsque ces travaux ont donné lieu à un article en cours d'écriture ou publié, celui-ci est ajouté en fin de partie de manière à clore le chapitre.

Chapitre 1

Organisation et mouvement cellulaire

Sommaire

1.1 Le changement de forme cellulaire **3**
1.2 La membrane cellulaire **9**
1.3 Le cytosquelette d'actine **10**
1.3.1 L'actine 12
1.3.2 La dynamique de polymérisation de l'actine *in vitro* 14
1.3.3 Les protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine 17
1.4 Les myosines **23**
1.5 Conclusion **27**

1.1 Le changement de forme cellulaire

La cellule est considérée comme l'entité élémentaire constituant la majorité des êtres vivants, que ce soit un organisme unicellulaire comme la paramécie ou pluricellulaire comme l'être humain qui est constitué de 10^{13} cellules. Si une cellule peut être vue très naïvement comme un sac de protéines isolées du monde extérieur par une membrane lipidique, ce modèle ne laisse pas apparaître sa réelle complexité. En effet, une cellule saine régule à tout moment sa structure interne, sa forme, ainsi que les échanges avec le milieu extérieur. Toutes ces fonctions sont extrêmement contrôlées et dépendent d'un ensemble de polymères biologiques formant des réseaux qui constituent en large partie le cytosquelette.

Les filaments formant le cytosquelette sont constitués de plusieurs molécules : les microtubules, les filaments d'actine ainsi que les filaments intermédiaires (FIG :1.1). Ces différents types de filaments, bien qu'agissant étroitement les uns avec les autres, possèdent chacun des propriétés mécaniques, biologiques et dynamiques différentes. Dans cette thèse, nous nous limiterons à l'étude du cytosquelette d'actine que l'on détaillera un peu plus loin.

Prenons l'exemple du mouvement cellulaire sur une surface : la reptation. Suivant la manière dont le réseau dynamique d'actine s'organise, il peut donner naissance à des

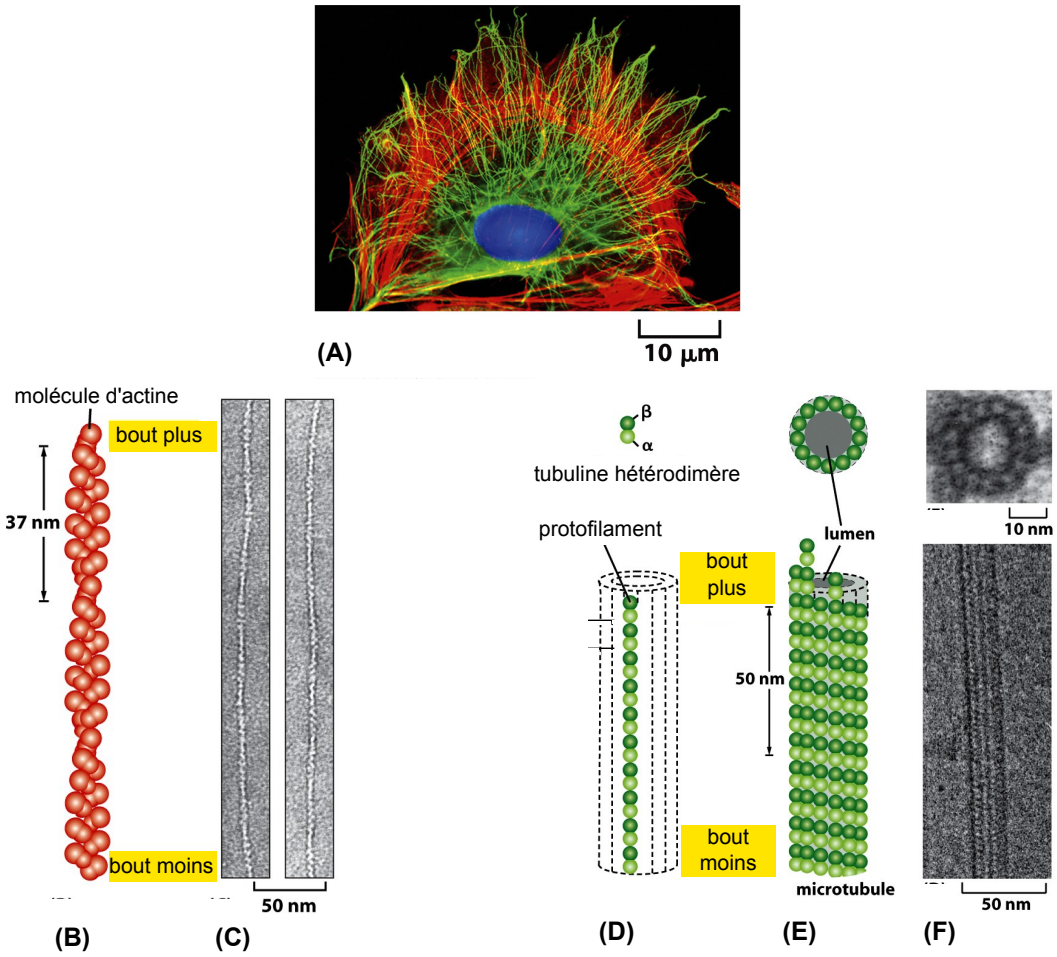


FIGURE 1.1 – Réseaux de filaments constituant le cytosquelette (actine et microtubules). A) Image de fluorescence d'une cellule fixée dont les microtubules sont marqués en vert, l'actine en rouge et le noyau en bleu. B) Représentation schématique d'un filament d'actine, avec son pas d'hélice de 37 nm. C) Microscopie électronique de filaments d'actine. D) Représentation schématique d'une sous unité composée de deux tubulines (hétéro-dimère) qui s'assemblent et peuvent former un protofilament de microtubule. E) L'assemblage cylindrique de 13 protofilaments permet de former un microtubule. F) Microscopies électroniques d'un microtubule prises dans le plan parallèle aux protofilaments (en bas) ou perpendiculaire aux protofilaments (en haut). On notera que dans les deux cas les filaments ont une orientation que l'on désigne par la notation de bout (+) ou bout (-). D'après [Alberts *et al.* 2002].

filopodes ou des lamellipodes, des structures que l'on retrouve à la région frontale d'une cellule en mouvement. De l'autre côté de la cellule se trouve une fine couche d'actine, d'épaisseur inférieure au micromètre, que l'on nomme le cortex d'actine. Celui-ci est capable de se rétracter, donnant alors une forme arrondie à ce côté de la cellule.

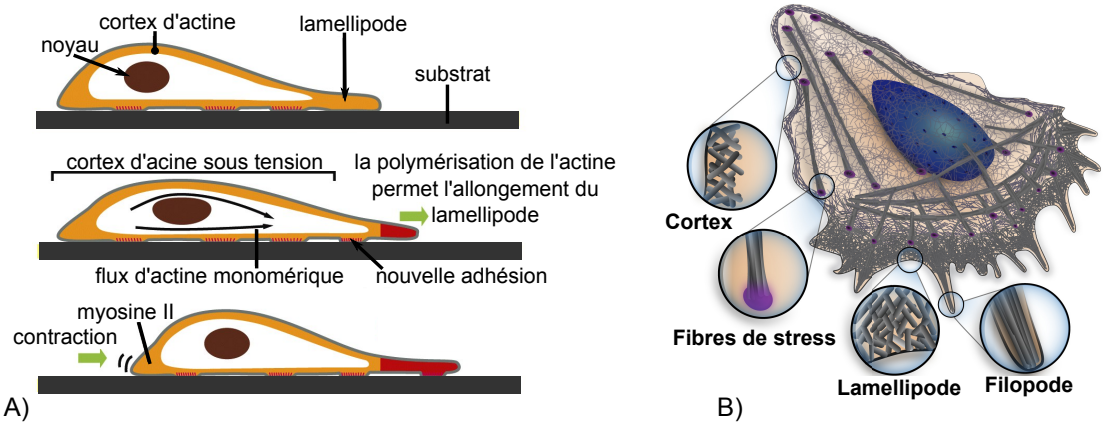


FIGURE 1.2 – A) Modèle du mouvement cellulaire, sur un plan, décomposé en trois étapes. Dans un premier temps, la cellule forme un lamellipode à son front de migration, une structure plane très fine de 200 nm d'épaisseur, extrêmement active qui s'étale sur le substrat. En parallèle de l'étalement du lamellipode la cellule forme de nouvelles adhésions focales qui permettent d'ancrer le lamellipode à la surface du substrat. Ces adhésions demeurent fixes par rapport au substrat et servent de points d'appuis au mouvement cellulaire. Enfin, l'arrière de la cellule se contracte, ce qui détache le corps cellulaire du substrat et entraine le noyau cellulaire vers le lamellipode, d'après [Alberts *et al.* 2002]. B) Représentation schématique des différentes architectures de l'actine au sein d'une cellule : le cortex, les fibres de stress, le lamellipode et le filopode. Les zooms permettent de mettre en évidence la différence structurale, d'après [Blanchoin *et al.* 2014].

Au bout des filopodes, des protéines membranaires stimulent la croissance du réseau d'actine qui vient alors pousser la membrane. Ensuite, la cellule s'ancre à la surface en créant des points focaux. Enfin, la rétraction à l'arrière de la cellule due à l'action d'un moteur moléculaire, la myosine II, contracte le cortex d'actine, permettant le rapatriement du contenu cellulaire vers l'avant. C'est la combinaison de ces trois étapes, localisées très spécifiquement à certains endroits de la cellule, qui permet le mouvement cellulaire, comme modélisé sur la FIG :1.2. La vitesse générée par ce mode de déplacement est de l'ordre de quelques micromètres par minute.

Le réseau d'actine, à travers les différentes formes qu'il peut prendre, joue un rôle essentiel dans la modification morphologique que peut subir une cellule. Il permet

de générer des forces, de répondre à des contraintes extérieures ou encore de sonder la matrice extra-cellulaire. En outre, on dénombre de nombreuses protéines liées à la polymérisation (protéines de réticulation/d'activation de la polymérisation), à la contraction (moteurs moléculaires) ou bien encore à l'ancrage de l'actine à la membrane. Les différentes combinaisons de ces protéines avec les filaments d'actine expliquent la diversité de comportements et de formes que peut avoir le réseau d'actine. Parmi ces réseaux on peut trouver :

Le cortex, qui lorsqu'il est examiné au microscope ressemble à une fine couche de 50 nm à 1 µm, riche en actine, se trouvant directement sous la membrane plasmique. Plusieurs études de ce réseau de filaments d'actine en microscopie électronique, sur différents types cellulaires, ont mis en évidence son caractère isotrope. Le réseau d'actine est dense et sa taille de maille varie entre 20 et 250 nm [Salbreux *et al.* 2012]. Le cortex d'actine, et sa contraction à l'arrière d'une cellule par les myosines sont indispensables à la locomotion de la majorité des cellules FIG :1.2.

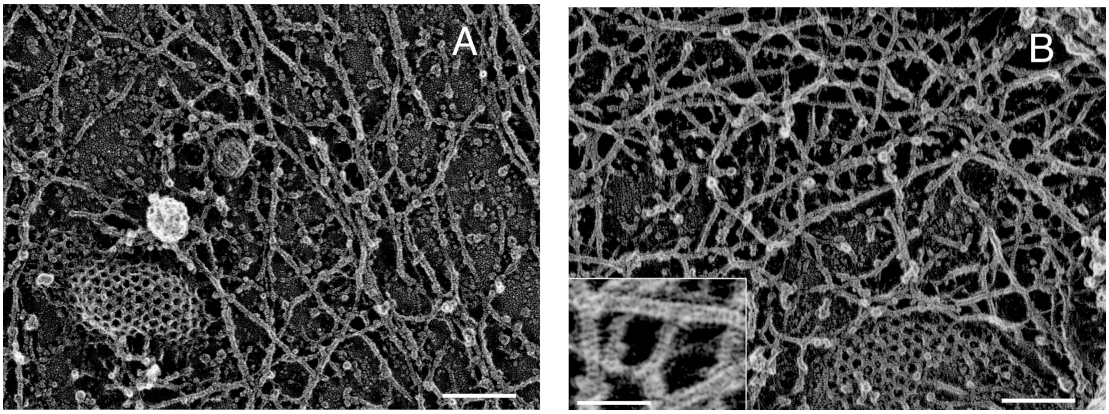


FIGURE 1.3 – Microscopie électronique de la surface interne d'une membrane plasmique de cellules de rat. A) Fibroblast, échelle 100 nm. B) Kératinocyte, échelle 100 nm et 50 nm pour l'encart. Le réseau filamenteux est constitué de filaments d'actine, l'agrandissement permet de mettre en évidence la périodicité de la structure composant ces filaments d'environ 5,5 nm (la taille d'un monomère). On remarquera aussi la présence de petites structures arrondies d'environ 50 nm, il s'agit de cavéoles (invagination de la membrane plasmique) ainsi que la présence d'un réseau polyédrale de Clathrines formant un manteau sur une autre vésicule. D'après [Morone *et al.* 2006].

Le lamellipode est une structure cellulaire de 200 nm d'épaisseur et de quelques micromètres de large qui se trouve au front de migration d'une cellule en reptation. Cette structure, en deux dimensions, est constituée d'un réseau dendritique d'actine dense, comme on peut l'observer en microscopie électronique (FIG :1.4). Ces clichés

mettent aussi en évidence une géométrie de branchement des filaments d'actine précise, formant en moyenne un angle de 67 ° [Svitkina *et al.* 1997].

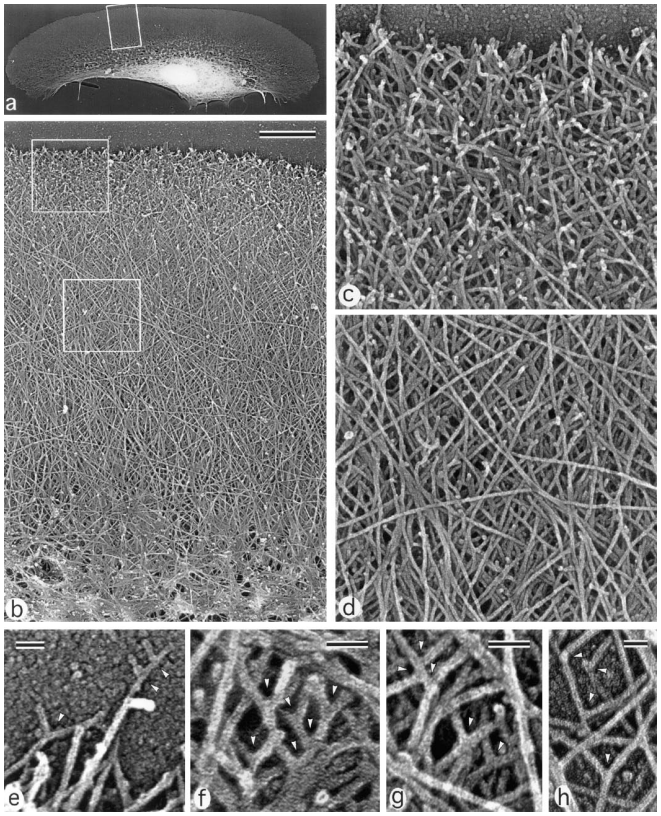


FIGURE 1.4 – Microscopie électronique du lamellipode d'un kératocyte. a) Vue complète des filaments d'actine au sein du lamellipode, dont la densité est plus importante au front de migration et diminue en s'approchant du noyau. b) Agrandissement de a) mettant en évidence la différence de structure du réseau d'actine entre les deux extrémités du lamellipode, le haut étant le front de migration du kératocyte. c) Nouvel agrandissement de b) au niveau du front de migration, on détecte un grand nombre d'extrémités de filaments d'actine. d) Agrandissement de b) au niveau du milieu du lamellipode. e-h) Les flèches indiquent la présence de branchements entre les filaments d'actine, qui existent dans tout le lamellipode, en partant du front de migration e) jusqu'à l'extrémité intérieure h). D'après [Svitkina *et al.* 1997].

Les filopodes, dont la première observation au microscope remonte à plus de 100 ans sont de longues ($\sim$ µm) et fines ($\sim$ 200 nm) protrusions [Ramon y Cajal 1890]. Ils sont souvent considérés comme des senseurs de l'environnement de la cellule. Ils se trouvent principalement à la région frontale d'une cellule en migration. Ces structures sont extrêmement dynamiques et capables de former, soit les premières adhésions focales avec

la matrice extracellulaire, soit des contacts entre cellules adjacentes [Bornschlögl 2013]. La microscopie électronique a permis de connaître l'organisation du cytosquelette qu'ils renferment, c'est-à-dire de longs filaments compacts d'actine (entre 15 et 30) organisés en faisceaux parallèles et non branchés [Small *et al.* 1978], [Lewis & Bridgman 1992]. Ces filaments d'actine pointent tous dans la même direction, le bout barbé se trouve à la pointe du filopode sous la membrane et de l'autre côté on peut constater que les filaments sont entremêlés au lamellipode FIG :1.5. Ils peuvent grandir ou se rétracter, pousser ou tirer en fonction des contraintes qui s'exercent sur eux. Il existe deux modèles de formation des filopodes appelés le modèle d'élongation convergente et le modèle de nucléation par le bout, décrits FIG :1.5,A. A l'heure actuelle, le modèle de l'élongation convergente est privilégié et appuyé par des expériences *in vitro* qui démontrent que la forme, l'orientation et la distance des sites de nucléation de l'actine contrôlent l'orientation des filaments et la formation de structures ressemblant aux filopodes [Reymann *et al.* 2010].

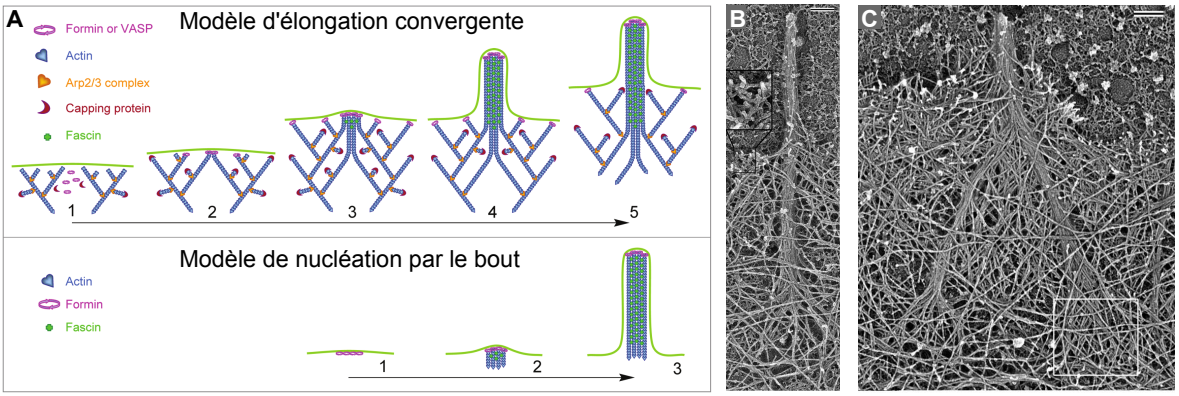


FIGURE 1.5 – A) Modèles mécanistiques de l'initiation des filopodes. En haut, le modèle d'élongation convergente : (1) un réseau d'actine branché par le complexe Arp2/3, (2) la croissance du réseau est maintenue par la formine, (3) l'interaction des filaments d'actine orientés assure une élongation synchronisée et parallèle, (4) les filaments sont liés et maintenus parallèles grâce à la fascine, formant un faisceau d'actine, (5) au cours du temps les complexes Arp2/3 ayant nucléé les filaments du filopode se dissocient. En bas, le modèle de nucléation par le bout : (1) un regroupement de formines à la membrane (2) nucléent des filaments d'actine et maintiennent leur élongation, (3) le faisceau d'actine est stabilisé par la fascine. D'après [Yang & Svitkina 2011]. B) Un filopode composé de fins faisceaux d'actine qui se séparent et se fondent dans le réseau constituant le lamellipode. C) Fusion de deux sous-faisceaux d'actine. Microscopie électronique d'après [Svitkina *et al.* 2003].

1.2 La membrane cellulaire

La membrane biologique permet tout d'abord d'isoler, en première approximation, le cytoplasme de l'environnement extérieur d'une cellule. Pour les organismes eucaryotes, l'ensemble des organelles telles que les mitochondries, le reticulum-endoplasmique ou bien encore l'appareil de Golgi sont des structures complexes compartimentées au sein du cytoplasme par des membranes. Chacune des membranes citées ci-dessus possède des propriétés différentes de par la variété des lipides qui la constitue mais aussi par l'ensemble des protéines dites membranaires ou trans-membranaires qu'elle peut contenir et qui lui donne sa particularité (FIG :1.6). Malgré tout, les membranes biologiques ont une structure générale commune : elles sont composées d'un assemblage spontané de deux couches de lipides d'environ 5 nm d'épaisseur, elles sont fluides et ont un comportement dynamique.

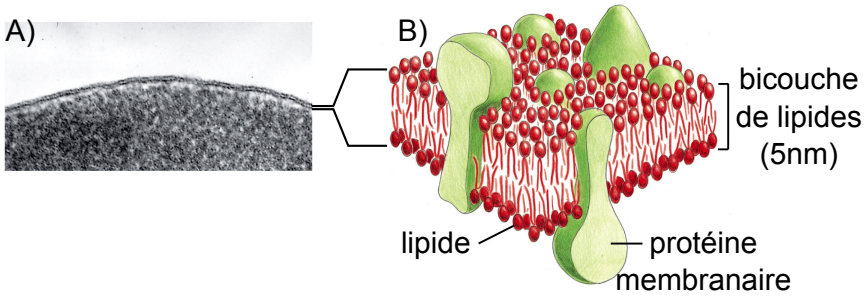


FIGURE 1.6 – A) Coupe en microscopie électronique d'une membrane plasmique de globule rouge humain. B) Schéma en trois dimensions de la membrane cellulaire avec en rouge les lipides, dont la disposition queue à queue permet de former deux couches. En vert sont représentées des protéines membranaires, adapté de [Alberts *et al.* 2002].

Au sens le plus large, on définit un lipide comme étant une molécule composée d'éléments organiques insolubles dans l'eau. Cependant de par leur grande hétérogénéité ils peuvent posséder beaucoup plus de caractéristiques physico-chimiques que cette simple définition. Les lipides possèdent de nombreuses fonctions biologiques, ils servent de composants à la membrane cellulaire, mais sont aussi connus pour participer aux voies de signalisation ou encore comme source d'énergie via leur oxydation [van Meer *et al.* 2008]. Il existe tout un pan de recherche qui s'intéresse particulièrement à l'analyse et à la compréhension de la multitude de molécules lipidiques : la lipidomique. La grande diversité des lipides vient essentiellement des multiples fonctions chimiques qu'ils peuvent présenter sur un squelette qui reste toutefois assez similaire (une chaîne carbonée).

Afin de les répertorier, ils ont été divisés en huit grandes catégories : les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingo lipides, les saccharolipides, les polycétides, les stérols et les prénols. Bien évidemment au regard de ce qui a été expliqué plus haut chacune de ces catégories est divisée en sous catégories qui possèdent elles-mêmes des sous catégories et ainsi de suite. Dans la FIG :1.7 sont représentées quatre des huit catégories, les plus présentes dans les membranes biologiques. Les lipides sont synthétisés, en grande majorité, dans le réticulum endoplasmique et rapidement répartis dans l'ensemble des membranes qui constituent une cellule. On remarquera que la distribution des lipides au sein des membranes cellulaires est loin d'être aléatoire, elle est même extrêmement contrôlée (FIG :1.8), que ce soit chez les mammifères ou chez la levure.

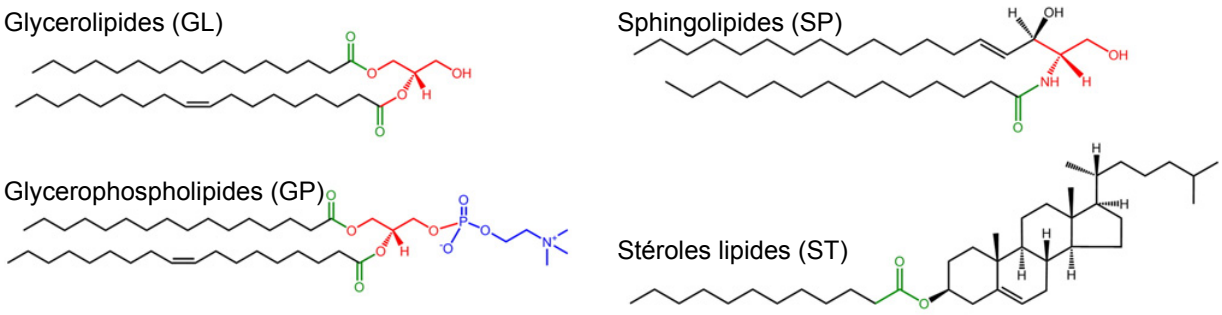


FIGURE 1.7 – Structure représentative de quatre catégories de lipides, les plus présents dans les membranes plasmiques. Les queues des lipides sont à gauche et les têtes à droite colorées afin de mettre en évidence les fonctions déterminant leur classe, d'après [Fahy *et al.* 2011].

En présence d'eau, spontanément et de manière à minimiser les interactions défavorables entre leurs chaînes hydrophobes et l'eau, les lipides sont capables de former des structures en trois dimensions (FIG :1.9). Parmi ces différentes formes, les trois structures les plus couramment utilisées en biophysique comme système modèle et simplifié de la membrane plasmique, sont la micelle, le liposome et la bicouche plane. Cependant, seul le liposome permet de mimer une membrane par sa composition mais aussi par sa géométrie et sa capacité à encapsuler, à l'intérieur, une solution différente du milieu extérieur, jouant ainsi le rôle de barrière.

1.3 Le cytosquelette d'actine

Pour comprendre comment une cellule change de forme ou migre, il faut s'intéresser à son cytosquelette et tout particulièrement à l'actine qui est son principal constituant.

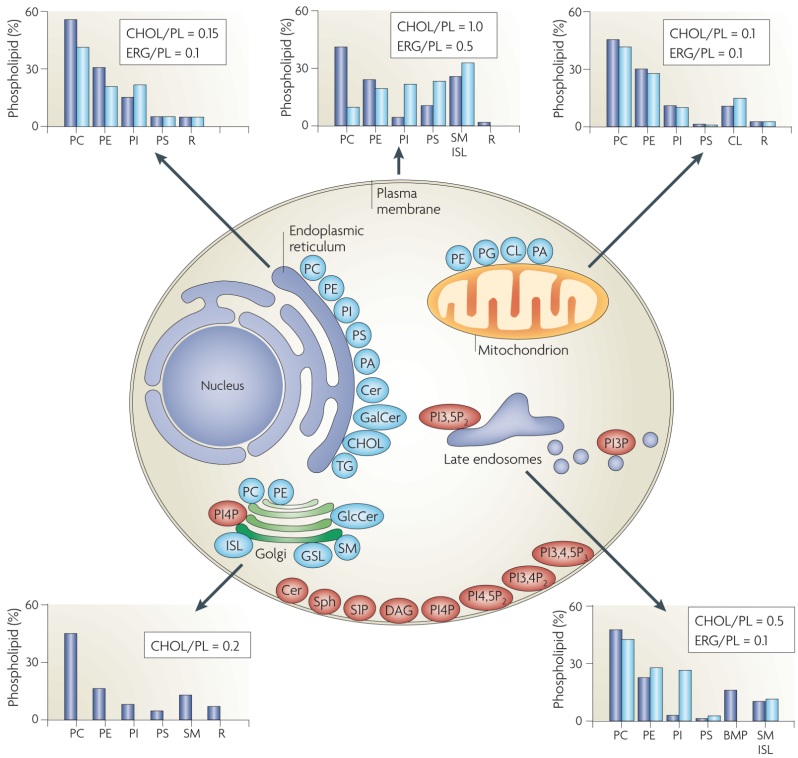


FIGURE 1.8 – Composition lipidique des différentes membranes cellulaires et lieu de synthèse des lipides pour une cellule de mammifère en bleu foncé et pour la levure en bleu clair. Les compositions sont données en pourcentage de la totalité des phospholipides constituant les membranes. Les ratio de cholestérol (CHOL, chez les mammifères) et d'ergostérol (ERG, chez la levure) par rapport aux phospholipides sont indiqués dans les encadrés. Le schéma central montre les lieux de synthèse de la majorité des phospholipides (compartiments bleus) et des lipides étant impliqués dans la signalisation intracellulaire (compartiments rouges). Abréviations utilisées : phosphatidylcholine (PtdCho ; PC), phosphatidylethanolamine (PtdEtn ; PE), phosphatidylinositol (PtdIns ; PI), phosphatidylserine (PtdSer ; PS), acide phosphatidique (PA),céramide (Cer), galactosylceramide (GalCer), triacylglycerol (TG), sphingomyeline (SM), glycosphingolipides (GSLs), inositol sphingolipide (ISL), diacylglycerol (DAG), cardiolipine (CL), bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), phosphatidylglycerol (PG), ; phosphatidylinositol-bisphosphate (PI(3,5)P2, PI(4,5)P2),phosphatidylinositol-trisphosphate (PI(3,4,5)P3), phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P), autre lipides (R), sphingosine-1-phosphate (S1P), sphingosine (Sph). D'après [van Meer *et al.* 2008].

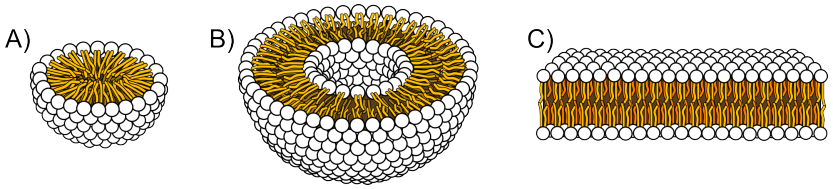


FIGURE 1.9 – Représentation en trois dimensions des trois principales strutures lipidiques utilisées en biophysique. A) La micelle, constituée d'une seule couche de lipides. B) Le liposome, constitué de deux couches qui emprisonnent un compartiment aqueux. C) La bicouche lipidique plane qui est en général déposée sur une lame de verre.

En effet, pour les cellules eucaryotes, l'actine représente environ 5% de la masse protéique totale. Ce pourcentage monte jusqu'à 20% pour les cellules musculaires. C'est le biochimiste Bruno Ferenc Straub qui, en 1942, fut capable d'extraire et d'isoler l'actine de cellules musculaires. Une année plus tard il mit en évidence l'existence de deux formes d'actine : l'actine G en l'absence de sel et l'actine F en condition saline physiologique [Straub 1943].

L'actine est une protéine qui a été extrêmement conservée au cours de l'évolution, de par son importance dans le maintien de l'architecture cellulaire et le grand nombre de protéines avec lesquelles elle interagit. On notera cependant qu'il existe six isoformes majeures d'actine chez les mammifères, classées en trois familles : l'actine α que l'on trouve dans les structures contractiles, l'actine β qui se trouve au front de migration des cellules en mouvement, et l'actine γ qui est présente dans les fibres de stress [Vandekerckhove & Weber 1978] et [Lodish *et al.* 2012]. Ces différentes formes d'actine ne possèdent que peu de variations sur leur structure et leur fonction. Biochimiquement, il est difficile de voir une différence sur leur capacité à polymériser ou même à interagir avec d'autres protéines. En effet, elles sont toutes codées, par une famille de gènes issus de la duplication et de la mutation d'un même gène ancestral [Erba *et al.* 1986].

1.3.1 L'actine

L'actine G, ou actine globulaire

L'actine sous forme monomérique, appelée actine G est une protéine globulaire de 43 kDa et de 5,5 nm de diamètre. Elle se compose de 375 acides aminés formant deux lobes séparés par une cavité. Une molécule d'ATP ou d'ADP ainsi qu'un cation divalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) sont capables de se lier à cette jonction (FIG :1.10,A). Chacun de ces deux lobes est à son tour dissociable en deux autres sous-domaines, les domaines I et III se trouvant du côté barbé, les domaines II et IV étant du côté pointu. L'actine G est capable de s'associer, pour former des filaments lorsqu'elle est mise en présence

d'ATP, d'ADP et d'un cation divalent. La dynamique de formation et la stabilité de ces filaments dépendent toutefois des concentrations utilisées.

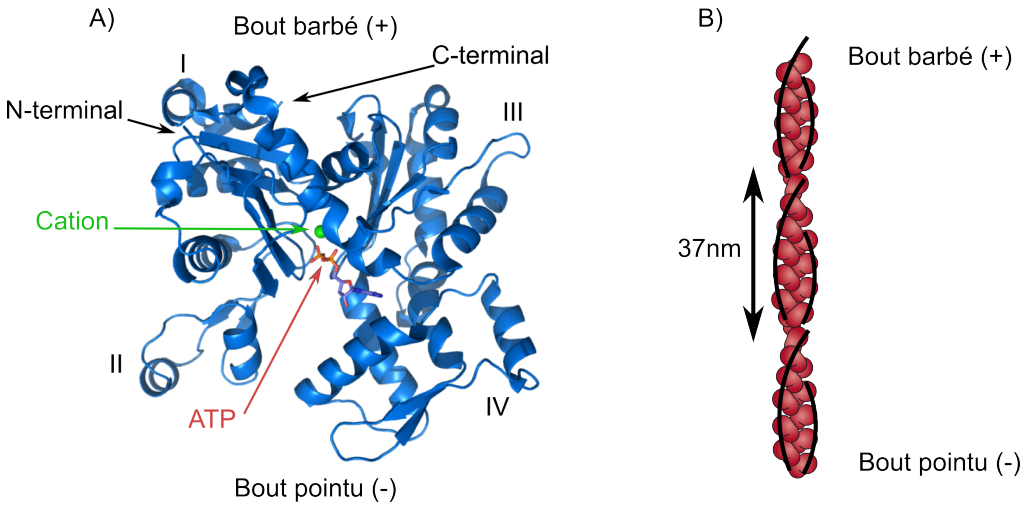


FIGURE 1.10 – A) Un monomère d'actine en bleu, complexé avec un cation divalent (en vert) et une molécule d'ATP (en rouge). Le monomère est divisé en deux lobes de taille comparable séparés par la cavité renfermant l'ATP et le cation. Chacun des lobes est divisé en deux sous domaines, notés I, II, III et IV. La structure est générée à l'aide du logiciel PyMOL d'après la structure de [Kabsch *et al.* 1990]. B) Structure d'un filament d'actine dont le diamètre varie entre 5 nm et 9 nm. La forme hélicoïdale du filament est mise en évidence par les lignes noires. Le pas de l'hélice est de 37 nm . Chaque monomère d'actine est inséré avec la même orientation dans le filament, les domaines I et III du côté $(+)$, les domaines II et IV du côté $(-)$. Cette polarité structurale induit une différence de comportement entre les deux extrémités d'un filament d'actine.

Le filament d'actine

L'actine F est formée d'une chaîne linéaire de monomères d'actine. Chaque monomère est en contact avec 4 autres. Cet assemblage peut être vu comme deux protofilaments parallèles formant une hélice dont le pas est de 37 nm (FIG :1.10,B). Un filament peut mesurer plusieurs µm de long. Les monomères d'actine sont assemblés de manière polaire (tête-à-queue). Cette directionnalité de polymérisation engendre un filament polaire avec deux bouts distincts appelés le bout barbé $(+)$ et le bout pointu $(-)$, ayant chacun sa propre dynamique d'assemblage. L'addition de monomères d'actine est dix fois plus rapide au bout barbé qu'au bout pointu. Mécaniquement, l'actine F peut être modélisée par un polymère semi-flexible dont le comportement varie en fonction de sa longueur. En dessous de sa longueur de persistance $l_p \sim 10\,\mu$m le filament d'actine se comporte comme un matériau rigide, au-dessus de cette longueur il est capable de se

courber. *In vivo*, de par la taille d'une cellule, les filaments d'actine doivent être vus comme semi-flexibles.

1.3.2 La dynamique de polymérisation de l'actine *in vitro*

La polymérisation de l'actine a été reproduite et étudiée *in vitro* afin de caractériser sa cinétique indépendamment, dans un premier temps, des autres protéines présentes dans une cellule. Le suivi de la dynamique de polymérisation en présence d'ATP permet de mettre en évidence trois phases (FIG :1.11) : la phase de nucléation, d'élongation et l'état stationnaire.

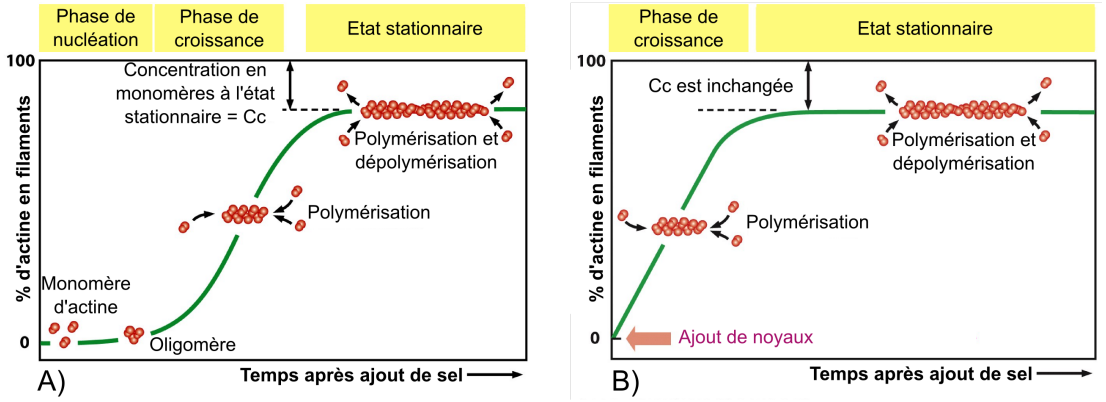


FIGURE 1.11 – Suivi de la polymérisation de l'actine en fonction du temps. La polymérisation est déclenchée par l'ajout de sel dans une solution contenant des monomères d'actine purs. La formation de noyaux d'actine, formés de trois monomères d'actine, est une étape cinétiquement lente qui peut être contournée si la polymérisation est initiée à partir d'une solution contenant déjà des oligomères. D'après [Alberts *et al.* 2002].

La phase de nucléation est l'étape cinétiquement déterminante. Lorsqu'on ajoute des sels en solution, les monomères d'actine G s'assemblent, de manière stable, par trois pour former un oligomère d'actine. Il s'agit du noyau initial, à partir duquel les monomères d'actine viendront s'ajouter. Ce délai dans la cinétique de réaction peut être supprimé si l'on ajoute directement des noyaux dans la solution.

La phase d'élongation apparaît après la formation des oligomères d'actine. L'actine G en solution s'additionne permettant l'élongation de l'oligomère en filament d'actine. Le nombre de monomères s'associant par seconde reste proportionnel à la concentration C de monomères en solution ($k_{on} \times C$) alors que le taux de dissociation d'un monomère au bout d'un filament reste constant (k_{off}). Du fait de la polarisation du filament, les constantes cinétiques d'addition (k_{on}) et de suppression (k_{off}) d'un monomère

d'actine sont différentes suivant que l'on regarde le bout pointu ou le bout barbé. Au cours de cette phase on modélise la croissance d'un filament d'actine par deux équations, une pour chaque bout du filament (indicé p pour pointu et b pour barbé) :

$$\frac{dn_b}{dt} = k_{on,b} \times C - k_{off,b} \tag{1.1}$$

$$\frac{dn_p}{dt} = k_{on,p} \times C - k_{off,p} \tag{1.2}$$

Si l'on s'intéresse à l'équation (1.1) par exemple, on peut voir qu'il existe une concentration critique $C_{c,b} = k_{off,b}/k_{on,b}$ pour laquelle $dn_b/dt = 0$. Ce qui signifie qu'à cette concentration, la polymérisation et la dépolymérisation au niveau du bout barbé du filament d'actine se compensent. La croissance du filament au bout barbé est nulle. Par contre, si la concentration en actine G se trouve inférieure à $C_{c,b}$, le bout va dépolymériser. Au contraire, si la concentration en actine G est supérieure à $C_{c,b}$ le bout va croître. Cette concentration critique est dépendante du bout considéré du filament d'actine mais aussi de l'état ATP ou ADP de l'actine [Pollard 1986]. En présence d'ATP et en première approximation on obtient $C_{c,b} = 0,12\,\mu\text{M}$ contre $C_{c,p} = 0,6\,\mu\text{M}$.

La phase stationnaire intervient lorsque la cinétique d'assemblage et de désassemblage des monomères d'actine se compensent, pour un filament donné dont la taille ne varie plus. Elle ne peut exister qu'en présence d'ATP et fait intervenir l'ensemble des équilibres biochimiques de polymérisation de l'actine et d'hydrolyse de l'ATP en ADP (FIG :1.12). Concrètement, si l'on résume l'ensemble des processus par leur constante cinétique à l'état stationnaire, l'actine-ATP s'associe au bout barbé et l'actine-ADP se dissocie majoritairement au bout pointu. C'est cette addition de monomères au bout barbé qui lui vaut sont appellation de bout (+), et inversement pour le bout pointu qui est représenté par un symbole (−). La conséquence de cette différence d'activité entre le bout (+) et le bout (−) engendre un effet dit de "tapis roulant". Si l'on suit la position d'un monomère d'actine dans un filament, il a été montré qu'il vient s'incorporer au bout (+) sous la forme ATP, migre vers le bout (−) s'hydrolyse et se dissocie du filament sous la forme ADP [Fujiwara *et al.* 2002] et [Pollard & Borisy 2003]. Dans ce cas on ne considère plus que deux constantes cinétiques k_{OFF} et k_{ON} qui permettent de remonter à la valeur de la concentration critique et de la constante d'équilibre thermodynamique qui sont respectivement $C_c = k_{OFF}/k_{ON}$ et $K = k_{ON}/k_{OFF}$. Sans l'hydrolyse de l'ATP le phénomène d'état stationnaire n'existerait pas. Cette hydrolyse se passe en deux temps (FIG :1.12) :

∘ L'ATP lié à l'actine est hydrolysé en ADP-Pi, le phosphate reste piégé dans la cavité du monomère d'actine avec l'ADP. C'est l'actine qui joue le rôle d'ATPase, l'ajout de sel (Mg^{2+} par exemple) à une solution de monomère d'actine induit sa polymérisation. Cependant, sous forme filamenteuse la vitesse d'hydrolyse de l'ATP

augmente d'un facteur 100 [Pollard & Weeds 1984]. L'actine ADP-Pi conserve les mêmes propriétés que l'actine ATP.

◦ Le phosphate finit par se dissocier, avec un temps de demi-vie de 6 minutes, laissant dans la cavité de l'actine un ADP.

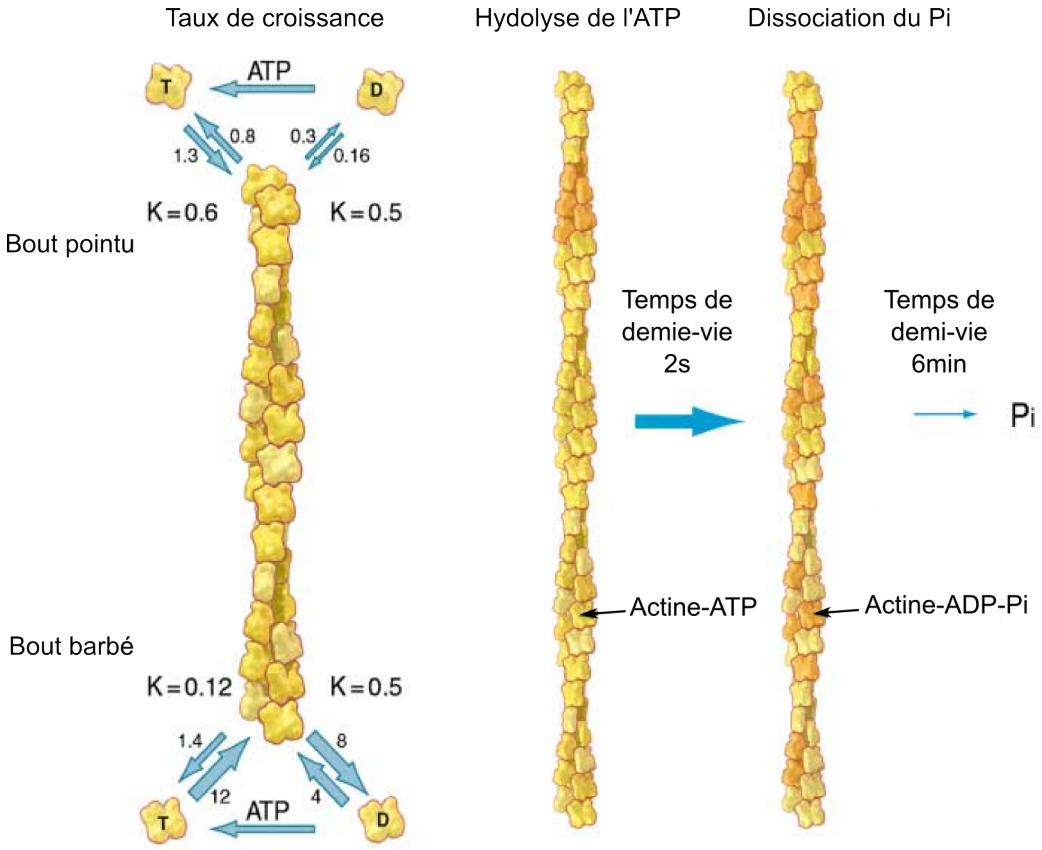


FIGURE 1.12 – Croissance d'un filament d'actine, hydrolyse de l'ATP et dissociation du phosphate. Sur le schéma de gauche, pour le bout barbé et le bout pointu, sont indiqués, les taux d'association des monomères d'actine en $\mu M^{-1}s^{-1}$, les taux de dissociation s^{-1} ainsi que le ratio du taux de dissociation sur le taux d'association qui représente la constante d'équilibre K. On remarquera que les constantes d'équilibres associées à l'actine-ATP diffèrent entre les deux bouts. C'est cette différence qui permet l'existence de l'effet "tapis roulant". A droite sont indiqués le temps caractéristique d'hydrolyse de l'ATP en ADP-Pi au sein d'un filament d'actine, puis pour le temps nécessaire au détachement du phosphate inorganique (noté Pi). D'après [Pollard & Borisy 2003].

On vient de voir qu'*in vitro*, l'actine pure, dans des conditions ioniques physiolo-

giques, est capable d'engendrer, grâce à sa polarité et à l'effet tapis roulant, un mouvement dirigé. Cependant, si l'on s'intéresse à la dynamique de l'état stationnaire, la croissance du filament au bout barbé, compensée par la dissociation au bout pointu, engendre une augmentation du filament de seulement 0.04 µm/min. Cette cinétique est de deux ordres de grandeurs en dessous de la vitesse que peut atteindre une cellule en mouvement telle que le kératocyte qui se déplace à des vitesses de l'ordre de 10 µm/min. A elle seule, la dynamique de polymérisation de l'actine ne peut pas expliquer les comportements cellulaires observés physiologiquement. Seules les interactions de l'actine avec d'autres protéines régulatrices peuvent expliquer cette différence d'ordre de grandeur.

1.3.3 Les protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine

Il est impossible d'expliquer la dynamique de polymérisation de l'actine ou bien la géométrie des différents réseaux qu'elle est capable de former (filopode, lamellipode, cortex) *in vivo* par des expériences *in vitro* si l'on n'utilise que de l'actine pure dans des conditions ioniques physiologiques. Pour expliquer ces comportements il est nécessaire de complexifier le système biochimique en faisant intervenir des protéines capables de se lier à l'actine, nommées les ABP (Actin-Binding Protein). Ces protéines jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la dynamique de polymérisation de l'actine. Les ABP sont capables de se lier directement aux filaments ou aux monomères d'actine et d'influencer la stabilité, la dépolymérisation, la réticulation, la nucléation, la formation de réseaux, la séquestration ou non des monomères [Goley & Welch 2006]. Toutes ces fonctions sont essentielles au bon fonctionnement d'une cellule. On dénombre une centaine de protéines partenaires de l'actine, nous illustrerons ici quelques exemples.

Les ligands de l'actine G

La concentration en actine G au sein du cytosol, pour la plupart des cellules, est extrêmement élevée et se situe aux alentours de 300 µM bien au-dessus de la concentration critique en solution ionique qui est d'environ 0,2 µM. Cette énorme différence s'explique par la présence de protéines capables de séquestrer l'actine G et de la rendre disponible rapidement lorsque la cellule en a besoin.

La profiline est une protéine dont le poids moléculaire est compris entre 14 et 15 kDa. Elle se lie préférentiellement aux monomères actine-ADP et favorise l'échange du nucléotide pour reformer six fois plus rapidement un monomère actine-ATP [Theriot *et al.* 1994]. Elle peut former un complexe avec l'actine en s'attachant au bout barbé, laissant libre la cavité contenant le nucléotide, qui se trouve de l'autre côté. L'actine ainsi liée à la profiline peut, quand même, polymériser mais uniquement en s'additionnant au bout (+) puisque l'autre côté du monomère est bloqué par la présence de la profiline. L'ajout du composé actine-ATP-profiline, au filament, engendre

un changement de sa configuration favorisant la dissociation de la profiline et rendant le bout (+) du filament d'actine à nouveau libre d'accepter un nouveau monomère. La profiline peut donc jouer deux rôles en fonction de l'accessibilité des bouts (+) des filaments d'actine : s'ils sont libres, la profiline favorise leur croissance, s'ils sont déjà occupés par une protéine de coiffe (présentée plus loin) elle jouera uniquement un rôle de séquestration des monomères d'actine. Il faut enfin noter que la profiline empêche la formation d'oligomère et donc toute nucléation spontanée des filaments d'actine dans les cellules.

La thymosine-β4 est la protéine séquestrante la plus abondante parmi les animaux supérieurs. C'est une petite protéine formée de 43 acides aminés capable de lier l'actine G avec une stoechiométrie 1:1, elle entre donc en compétition avec la profiline. Elle empêche la nucléation et la polymérisation de l'actine ainsi que l'échange du nucléotide ou l'hydrolyse de l'ATP lié à l'actine. Son affinité pour l'actine ATP est 50 fois plus élevée que pour l'actine ADP [Carlier *et al.* 1993]. Sa relativement faible affinité pour l'actine (K_d=2-4 µM pour Ca^{2+}-actine-ATP et K_d=0.7-2 µM pour Mg^{2+}-actine-ATP) ainsi que sa forte concentration *in vivo*, de l'ordre de 0.5mM, permettent à la cellule d'avoir un réservoir d'actine G qu'elle peut contrôler spatialement et temporellement.

Les protéines nucléatrices de l'actine

In vivo, la formation des filaments d'actine est contrôlée spatialement par la cellule. La production spontanée de filaments étant rendue quasiment impossible par la présence des protéines séquestrantes, la nucléation d'un filament a principalement lieu au niveau de la membrane plasmique. Afin d'engendrer un nouveau filament, la cellule fait intervenir des protéines appelées les protéines nucléatrices. Il existe plusieurs types de nucléateurs qui sont à l'origine de la diversité des structures que peut prendre un réseau d'actine.

Le complexe Arp2/3 est constitué de 7 sous-unités parmi lesquelles deux protéines Arp2 et Arp3 présentent environ 45% d'identité avec l'actine [Machesky *et al.* 1994]. Il est présent dans de nombreux organismes, de la levure aux mammifères et a été très conservé au cours de l'évolution. Une fois activé, le complexe Arp2/3 se lie à un filament d'actine pré-existant et engendre, selon un angle d'environ 70°, la nucléation d'un nouveau filament qui ne tardera pas à s'allonger puisqu'il expose son bout barbé [Machesky *et al.* 1999], [Rouiller *et al.* 2008]. Le bout pointu du nouveau filament est donc coiffé par le complexe Arp2/3 et lié au filament mère (FIG :1.13). Ce modèle est dit "de nucléation dendritique" car il engendre la formation d'un réseau dendritique d'actine au front de migration des cellules en mouvement. Le complexe Arp2/3 est initialement inactif, son activation nécessite l'action concertée de plusieurs

composants : un activateur, un filament d'actine pré-existant et des monomères d'actine.

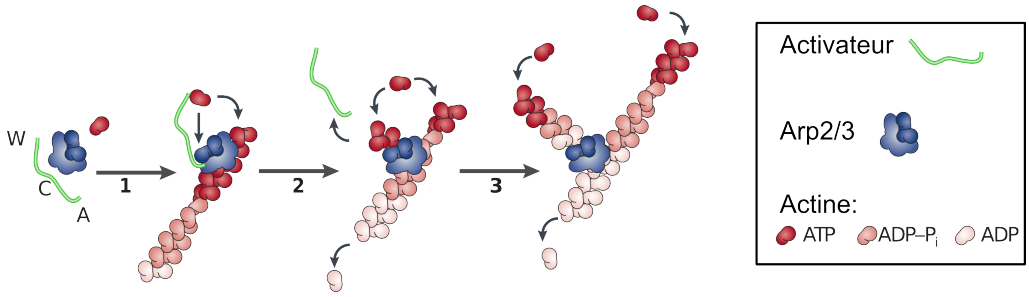


FIGURE 1.13 – Modèle de l'activation et de la nucléation du complexe Arp2/3. Le complexe Arp2/3 est initialement inactif. (1) L'activation du complexe Arp2/3 nécessite qu'il se lie à un activateur (WCA, en vert) pour induire un changement de sa conformation et lui permettre de se lier à un filament d'actine pré-existant. (2) Un filament d'actine est alors initié par la présence du complexe Arp2/3 et l'activateur se dissocie. (3) Le nouveau filament ainsi que le filament pré-existant croissent par l'addition de monomères d'actine. L'angle entre ces deux filaments, caractéristique de la nucléation par le complexe Arp2/3, mesure 70°. Adapté de [Goley & Welch 2006].

Il existe de nombreux activateurs. Parmi eux se trouvent la protéine WASp (Wiskott-Aldrich Syndrom protein), son homologue neuronal N-WASp, ou encore SCAR/WAVE. Tous ces activateurs ont en commun un motif WH2-C-A en C-terminal, nommé WCA. Ces protéines sont initialement inactivées, en effet la protéine s'auto-inhibe en se repliant sur elle-même. Ce n'est seulement qu'en interagissant avec plusieurs partenaires dont le lipide Pi(4,5)P2, la protéine CDC42, et une protéine à domaine SH3 que l'activateur "s'ouvre". Cette nouvelle conformation lui permet alors d'activer le complexe Arp2/3 (FIG :1.14). C'est la présence des domaines CA qui permettent la liaison au complexe Arp2/3 alors que les domaines WC possèdent une grande affinité pour l'actine. La région WCA permet donc à la fois d'activer le complexe Arp2/3 et d'apporter le premier monomère d'actine nécessaire à la formation du nouveau filament. En laboratoire, nous reproduisons la nucléation par le complexe Arp2/3 à l'aide d'une protéine dont la construction a permis de remplacer tous les domaines présents avant la région PP (de WIP à GDB) par une streptavidine, de ce fait la protéine est toujours en conformation active (FIG :1.14).

Les formines sont une famille de protéines dimériques capables de nucléer l'actine en capturant deux monomères d'actine. Chaque sous-unité de la formine possède deux domaines, FH1 et FH2 extrêmement bien conservés. Le domaine FH1 est riche en polyproline, ce qui lui permet d'interagir avec la profiline et d'amener

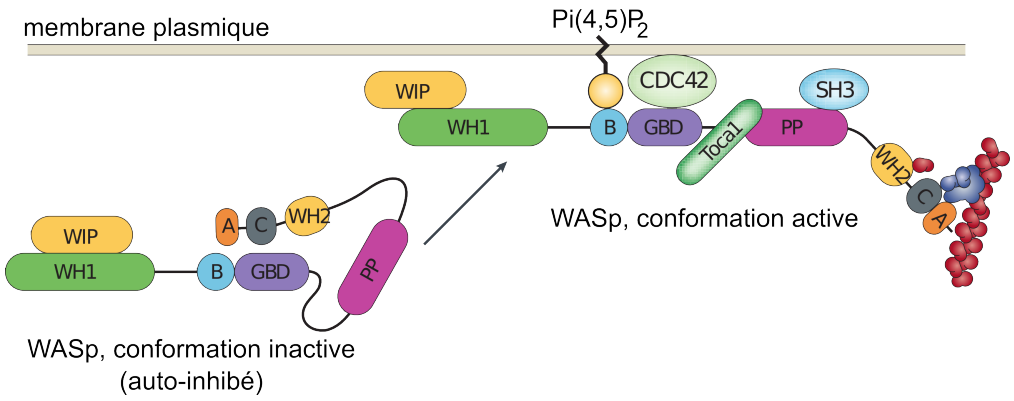


FIGURE 1.14 – Organisation des domaines de WASp. Initialement l'activateur est replié sur lui même et auto-inhibé. Son activation est régulée par plusieurs partenaires : le lipide Pi(4,5)P_2, la protéine CDC42 et des protéines à SH3 domaine (telles que NcK, Grb2, Toca1) qui se lient respectivement à la région basique (B), le domaine GTPase (GDP) et le domaine Poly-proline (PP) de la protéine WASp. Une fois dépliée le domaine WCA (WH2-C-A) de la protéine est libéré, ce qui permet l'activation du complexe Arp2/3 qui peut alors nucléer un nouveau filament. D'après [Goley & Welch 2006].

des monomères d'actine séquestrés. Le domaine FH2 est, quant à lui, capable de se lier au bout barbé des filaments. Lorsque le filament croît, la formine reste associée au bout (+) par son domaine FH2, tout en ajoutant de nouveaux monomères qu'elle capture par son domaine FH1 [Watanabe *et al.* 1997], [Pruyne *et al.* 2002], [Pring *et al.* 2003]. Contrairement au complexe Arp2/3, les formines sont des nucléateurs qui allongent le filament d'actine, par le bout barbé, de manière processive tout en le protégeant des protéines de coiffe puisqu'elles restent liées au bout (+) (FIG :1.15).

Spire, Cobl et Lmod sont d'autres nucléateurs, découverts plus récemment [Quinlan *et al.* 2005], [Le Goff *et al.* 2006]. La protéine spire peut nucléer des filaments d'actine à des vitesses inférieures à celles induites par le complexe Arp2/3. Elle possède quatre domaines WH2, chacun d'eux pouvant se lier à un monomère d'actine. Ce regroupement de monomères serait à l'origine de la formation d'une structure comparable à un noyau à partir duquel un nouveau filament peut s'allonger. Cependant, et contrairement à la formine, spire reste fixée à l'extrémité pointue du filament, l'élongation se faisant au bout barbé (FIG :1.15). Les protéines Cobl et Lmod possèdent également plusieurs domaines de liaison au monomères d'actine et agissent d'une manière similaire à la protéine spire.

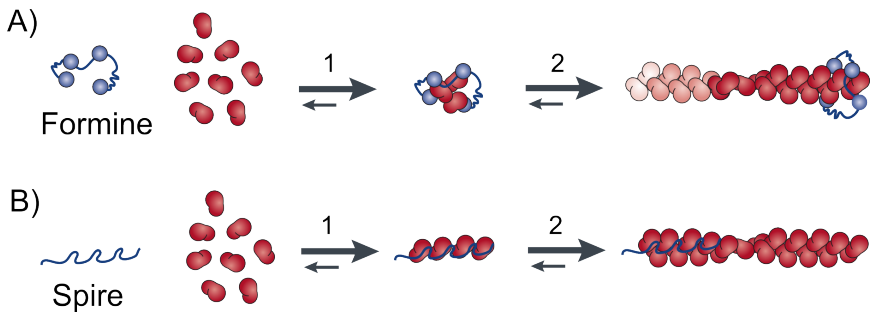


FIGURE 1.15 – A) Modèle de la nucléation et de l'élongation d'un filament d'actine par la formine. Contrairement au complexe Arp2/3, la formine reste associée au bout (+) du filament tout en stimulant sa croissance B) Modèle de la nucléation par spire. Adapté de [Goley & Welch 2006].

Les protéines de coiffe ou "capping proteins"

Afin de ne pas épuiser rapidement le stock d'actine G mobilisable par la cellule, il existe des protéines qui contrôlent la croissance des filaments d'actine. Ces protéines interagissent fortement avec les extrémités des filaments et sont capables de bloquer la polymérisation. Dans un premier temps on pourrait imaginer que réduire la polymérisation de l'actine peut avoir un effet négatif sur la dynamique cellulaire. Cependant, la déplétion de ces protéines affecte le changement de forme et la motilité cellulaire, elles ont un rôle de régulation essentiel.

La capping protéine (CP) se lie au bout (+) des filaments avec une grande affinité (K_d=0.1-1 nM) , [Schafer *et al.* 1996]. Le filament ne peut plus que subir une dépolymérisation au niveau du bout (−). Elle permet de réguler la longueur des filaments et ainsi la forme du réseau d'actine [Kawska *et al.* 2012]. Une trop grande concentration en CP empêche les filaments de s'enchevêtrer en réduisant de manière drastique leur taille alors qu'une faible concentration en CP favorise la croissance de filaments par le bout (+).

La gelsoline tire son nom de sa capacité à couper et coiffer les filaments, en réduisant la taille des filaments elle peut transformer un réseau solide en gel d'actine (transition de phase). Contrairement à la CP, elle ne se lie pas directement au bout barbé. La gelsoline se fixe le long d'un filament entrainant une déstabilisation du filament d'actine qui finit par se casser. La rupture du filament laisse alors le bout barbé coiffé par la gelsoline, ce qui empêche l'addition de nouveaux monomères [Janmey *et al.* 1985].

Les protéines de fragmentation ou "severing proteins"

Le rôle des protéines de coiffe couplé aux protéines de fragmentation permet d'augmenter l'efficacité du renouvellement du stock d'actine G disponible. Les protéines de fragmentation sont spécialisées dans le désassemblage des filaments. La **gelsoline**, présentée plus haut possède une telle activité, en plus de son effet de coiffe.

l'ADF/cofiline pour Actin Depolymerisation Factor sont de petites protéines de 15 à 22 kDa. Elles se lient préférentiellement à l'actine ADP et accélèrent le relarguage du Pi. Mécaniquement, la cofiline est capable de changer la structure hélicoïdale du filament et d'engendrer une torsion supplémentaire de 5° par sous-unité de la double hélice, favorisant la fragmentation du filament [McGough *et al.* 1997], [Mccullough *et al.* 2011]. Il est aussi montré qu'un filament partiellement décoré par la cofiline sera préférentiellement fractionné au niveau de la frontière entre la partie nue et la partie décorée du filament. Ce phénomène dépend de la densité linéique de cofiline sur le filament [Suarez *et al.* 2011].

Les protéines de réticulation (les "cross-linkers")

Au sein de la cellule, l'actine polymérisée forme deux types d'architectures : des faisceaux ou des réseaux branchés. Ces deux types de structures sont initiées par différents nucléateurs, (respectivement les formines et le complexe Arp2/3) et stabilisées par deux grandes catégories de protéines capables de se lier à chacun de ces types de réseaux. Les protéines intervenant dans la stabilisation des structures en faisceaux lient généralement les filaments de manière parallèle alors que les protéines stabilisant les réseaux branchés lient les filaments avec une grande flexibilité d'orientation.

Les faisceaux d'actine sont formés par l'α-actinine, la fimbrine, la fascine, la scruine, et la villine. Ces protéines engendrent des faisceaux plus ou moins serrés d'actine, de par la distance entre leurs sites de liaison au filament. La fimbrine, dont les deux sites de liaison à l'actine sont adjacents, forme des faisceaux denses et rigides espacés de 14 nm alors que l'α-actinine forme un faisceau plus lâche avec des filaments espacés de 30 nm. C'est cette différence de distance entre les filaments d'actine qui explique que ces protéines de réticulation s'excluent les unes par rapport aux autres (FIG :1.16).

Les réseaux branchés initiés par le complexe Arp2/3, qui de par son mécanisme de nucléation est aussi un agent réticulant puisqu'il forme un branchement de 70° entre un filament mère et celui qu'il initie (FIG :1.16). Mais n'importe quelle protéine possédant deux sites de liaison à l'actine, séparés par une longue jonction, permet de créer un réseau branché à trois dimensions. On peut donner l'exemple du dimère de filamine

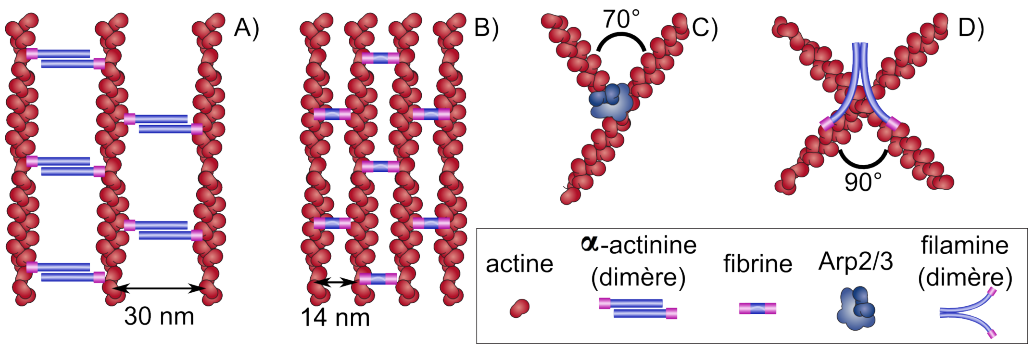


FIGURE 1.16 – A) L'α actinine, qui est un homodimère, lie les filaments d'actine en un faisceau souple. La distance importante entre les filaments (30 nm) permet facilement à d'autres protéines de venir interagir avec ce réseau, comme la myosine II. B) La fibrine forme, au contraire, un faisceau de filaments d'actine très serré. C) Le complexe Arp2/3, en plus d'être un nucléateur de la polymérisation de l'actine peut aussi être vu comme une protéine de réticulation entre deux filaments, formant un angle de 70° entre eux. D) La filamine est un homodimère dont la sous-unité mesure près de 160 nm de long lorqu'elle est complètement dépliée. Ce dimère lie deux filaments d'actine avec un angle flexible d'environ 90°, la fexibilité de cette liaison engendre un réseau très visqueux. D'après [Alberts *et al.* 2002].

qui permet de lier, quasiment perpendiculairement et de manière très flexible, deux filaments adjacents formant ainsi un gel flexible et très visqueux d'actine.

1.4 Les myosines

En 1864, le physiologiste Wilhlem Kühne parvient à extraire, à l'aide de solutions concentrées en sel, une substance présente dans le muscle qu'il nomme la myosine, qui fut donc découverte bien avant l'actine. Il faudra attendre 1939 pour que Englehardt et Ljubimowa découvrent son activité ATPase qui était alors supposée être la source d'énergie nécessaire à la contraction musculaire [Engelhardt & Ljubimowa 1939]. C'est durant la même année, que Albert Szent-Györgyi le démontrera, à l'aide d'un système artificiel de fibres musculaires composées d'actine et de myosine qui ne se contracte qu'en ajoutant de l'ATP [Szent-Györgyi 1945], [Szent-Györgyi 2004]. Il n'existe pas qu'une seule forme moléculaire de la myosine, bien au contraire, il s'agit d'une famille de moteurs moléculaires composée d'au moins une vingtaine de classes différentes (notées de I à XX). Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions intracellulaires : la migration, l'adhésion, la localisation des organelles, le transport intracellulaire. De plus, leurs structures ont été extrêmement bien conservées à travers les espèces, de ce fait, de la myosine II purifiée à partir de muscles de lapin est capable de se lier et

de contracter des filaments d'actine provenant d'amibes. Nous ne parlerons ici que de la myosine II, dite myosine conventionnelle. C'est cette myosine qui est responsable de la contraction des cellules musculaires. Les cellules non musculaires, quant à elles, possèdent une autre isoforme de la myosine qui est également capable d'engendrer la contractilité de structures d'actine.

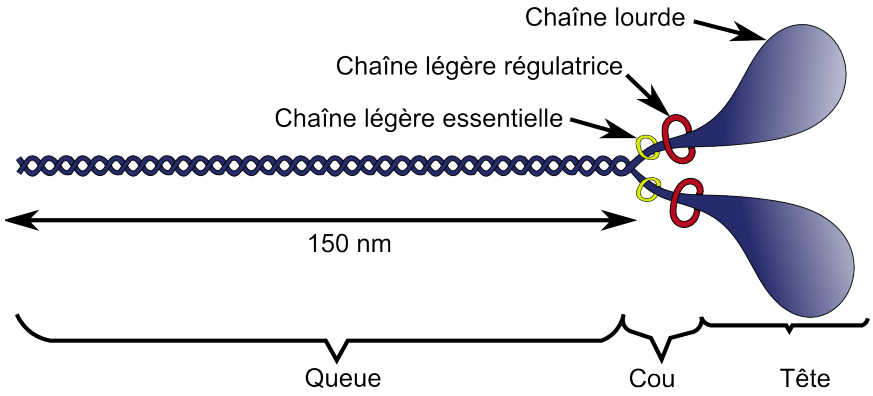


FIGURE 1.17 – Représentation schématique d'une molécule de myosine II. Il s'agit d'une protéine composée de deux chaînes lourdes enroulées par leur côté C-terminal (formant la queue de la protéine), et quatre chaînes légères. Les chaînes légères sont de deux types différents, et une copie de chaque type est présente sur chaque tête de la myosine.

La myosine II est une protéine homodimérique d'envrion 2×240kDa. Elle est constituée de deux chaînes lourdes (2×200kDa) dont les têtes, se trouvant du côté N-terminal, permettent la liaison à l'actine et l'hydrolyse de l'ATP. Les têtes sont chacune reliées à une longue queue, se trouvant du côté C-terminal, lui permettant de se dimériser en formant un faisceau d'hélice α. Les deux têtes et la queue de la myosine II sont liées par une partie nommée le cou, c'est à ce niveau que l'on retrouve deux paires de chaînes légères (2×20kDa) liées chacune à une tête. Au total, une myosine II est donc constituée de 6 sous-unités.

Le cycle de la myosine II

Le mouvement de la tête de la myosine II sur un filament d'actine se déroule en un cycle de 5 étapes (FIG :1.18) :

1- Commençons ce cycle au moment où la tête de la myosine II est repliée sur elle-même et liée à un monomère d'actine sans ATP ou ADP. Cette configuration est stable, c'est elle qui se trouve à l'origine de la rigidité cadavérique.

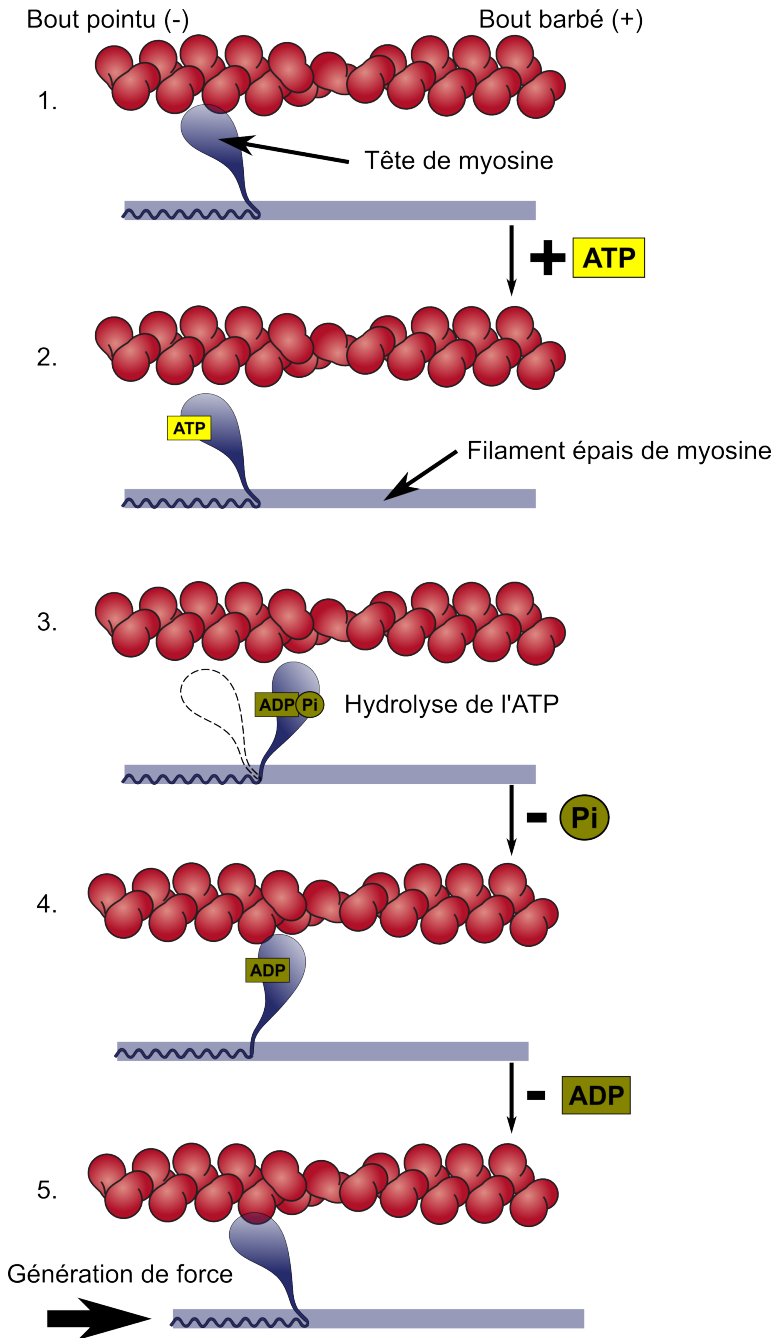


FIGURE 1.18 – Représentation schématique du cycle en cinq étapes de la myosine II sur un filament d'actine tel qu'expliqué dans le texte. D'après [Alberts *et al.* 2002].

2- Une molécule d'ATP vient se fixer sur une tête de la myosine qui se détache alors de la molécule d'actine.

3- L'hydrolyse de l'ATP en ADP-Pi permet à la tête de la myosine de se déplier. Cette nouvelle conformation déplace la tête de la myosine d'environ 10 nm.

4- La tête de la myosine ainsi activée est fortement attirée par des sites de liaison situés sur les molécules d'actine. Elle s'accroche donc au site le plus proche.

5- Pendant cette phase d'accrochage, la tête de myosine se replie sur elle-même après avoir libéré le Pi. Elle entraîne, dans son mouvement, la molécule d'actine avec une force de 2-4 pN. Ce déplacement consomme l'énergie emmagasinée dans la tête qui repasse à un niveau de basse énergie, l'ADP est à son tour libérée laissant la place libre pour de nouvelles molécules d'ATP.

Le principe de contraction reste le même pour tous les types de myosine II malgré les différences structurelles qu'elles peuvent avoir. La myosine II musculaire a la particularité de pouvoir s'agréger en filaments fins ou en filaments épais en fonction de la concentration de sel dans le milieu. Cette différence morphologique implique une importante différence de comportement.

En effet, la myosine II unique, passe seulement 5% du temps total de son cycle liée à l'actine. Autrement dit, elle n'est pas processive puisqu'elle se détache immédiatement après que la tête ait avancé d'un pas en direction du bout (+) du filament d'actine. Cependant, lorsque l'on diminue la concentration en sel KCl, les myosines II s'assemblent en fins filaments orientés queue à queue. Les têtes des myosines se trouvent de chaque coté de ce filament fin bipolaire, cette géométrie permet alors de contracter des filaments d'actine dans des directions opposées. *In vitro*, à faible concentration en sel KCl on forme de longs filaments de l'ordre du micromètre contenant une centaine de myosines, à $\sim$ 150 nM en KCl on obtient des mini-filaments composés d'une dizaine de myosines faisant environ 0,6 µm et si l'on augmente la concentration à $\sim$ 300 nM en KCl ou finit par obtenir des myosines monomériques [Alberts *et al.* 2002], [Soares *et al.* 2011], [Reisler *et al.* 1980], [Koretz 1982]. Le nombre important de têtes de myosines présentes dans un mini-filament ou dans un filament épais augmente, par l'effet collectif, la durée de liaison du filament de myosine au filament d'actine, ce qui a notamment pour effet de rendre la myosine II processive, dans ces conditions.

Motility assay

Le test de motilité des myosines permet de vérifier l'aptitude des moteurs moléculaires à se déplacer sur un filament d'actine. Le principe consiste à immobiliser les moteurs moléculaires sur une surface plane et à observer le déplacement des filaments d'actine que l'on vient déposer sur le tapis de myosines [Kron & Spudich 1986]. En temps normal les filaments sont capables de glisser sur le tapis avec des vitesses de l'ordre de

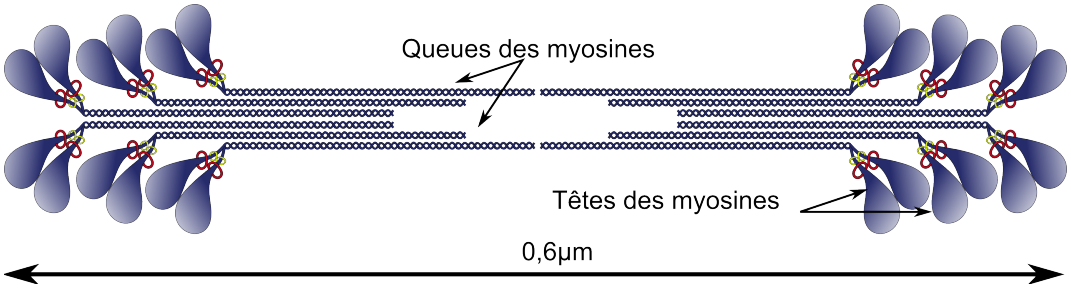


FIGURE 1.19 – Représentation schématique de myosines II assemblées en filament épais bipolaire. Les myosines s'agrègent par leurs queues, leurs têtes étant tournées vers l'extérieur. Au centre du filament se trouve une zone "nue", uniquement formée des queues de myosines. D'après [Alberts *et al.* 2002].

quelques µm/s. Afin de s'assurer de la stabilité des filaments d'actine, ils sont en général stabilisés avec de la phalloïdine. Cette drogue empêche toute dépolymérisation de l'actine-F. L'observation de la dynamique des filaments d'actine est rendue possible par deux méthodes, soit par l'ajout de monomères fluorescents d'actine, soit par l'utilisation d'une phalloïdine fluorescente. Le protocole utilisé pour vérifier le fonctionnement des moteurs moléculaires est donné en Annexe C.

1.5 Conclusion

Ce premier chapitre permet d'introduire toutes les notions biochimiques qui sont à la base de mon sujet de thèse. C'est-à-dire, à l'origine de la motilité et du changement de forme cellulaire. Cependant, au lieu de faire intervenir le cytosquelette dans sa totalité ainsi que la membrane plasmique notre étude s'appuie sur des systèmes simplifiés. On utilise une membrane modèle, le liposome, comme support de réactions biochimiques afin de mimer, à l'aide de protéines purifiées, un cortex d'actine à sa surface. C'est ce que l'on appelle un système biomimétique. Le chapitre suivant se focalise sur l'émergence de ces systèmes et leurs apports dans l'étude du cytosquelette d'actine.

Chapitre 2

Les systèmes biomimétiques pour l'étude du cytosquelette d'actine

Sommaire

2.1 Les systèmes biomimétiques à base de billes 31

2.1.1 La propulsion de *Listeria monocytogenes* 31

2.1.2 De *Listeria monocytogenes* à la bille 33

2.1.3 Caractérisation mécanique et biochimique de la brisure du cortex d'actine 35

2.1.4 La diversité des systèmes biomimétiques 36

2.2 Les liposomes 37

2.2.1 Les différents types de vésicules 39

2.2.2 Techniques de formation des GUVs 40

2.2.3 Le liposome utilisé comme milieu de réaction : les bioréacteurs . 45

2.2.4 Le liposome "inversé", utilisé comme support de réaction 48

2.2.5 La physique des membranes 49

2.3 Conclusion 54

Le chapitre précédent se focalise sur les phénomènes de changement de forme et de migration cellulaire. Il illustre déjà la complexité du vivant à travers les exemples biochimiques utilisés. De par la multitude des interactions entre protéines il est très difficile de réaliser des mesures quantitatives sur un composant d'un système vivant sans risquer de modifier d'autres paramètres. Un physicien dirait qu'il est tout simplement impossible de faire une mesure sans perturber le système. Le problème en biologie est encore plus complexe car il est aussi difficile de quantifier les perturbations que l'on engendre.

La biologie moléculaire a pour objectif d'identifier, pour un phénomène donné, l'ensemble des protéines qui interviennent dans la mise en place de ce processus ainsi que leur rôle. Une façon de mener ces investigations consiste à simplifier le modèle étudié. Il existe deux cheminements scientifiques complémentaires, si l'on prend l'exemple d'une cellule :

• La première approche consiste à inhiber ou même enlever les éléments cellulaires à l'origine du mécanisme étudié. En le décomposant de la sorte, on simplifie progressivement l'objet cellulaire. Cette manière d'analyser un mécanisme, en partant de la cellule, et en la simplifiant est qualifiée de descendante ("top-down").

• La deuxième approche est qualifiée d'ascendante ("bottom-up"). Elle est basée sur la reconstruction d'un comportement cellulaire par l'ajout de protéines purifiées. Elle n'intervient qu'après une étude préalable de chacun des constituants *in vivo* et *in vitro*. Une fois que la biochimie de chacun des constituants est analysée, on complexifie le système en étudiant leur interaction et l'on tente enfin de reproduire un comportement cellulaire. Cette méthode permet alors de connaître le nombre d'éléments nécessaires et suffisants utilisés par l'objet cellulaire, c'est un système mimant le vivant qui a l'avantage d'être minimaliste.

Un exemple de cette démarche, appelée "biomimétique" est la reconstitution, dans un système *in vitro*, du mouvement de la bactérie *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie, intracellulaire, se déplace en détournant la machinerie cellulaire à la base du mouvement des cellules : pour se propulser, elle active la polymérisation de l'actine à sa surface, tout comme une cellule le fait à son front de migration, au niveau du lamellipode.

Le mouvement de *Listeria* a d'abord été observé dans des extraits cellulaires. Ces études ont permis de définir les protéines nécessaires à la propulsion de la bactérie et de mettre au point un mélange de protéines purifiées dans lequel le mouvement de *Listeria* a pu être reproduit. Une étape supplémentaire, dans la caractérisation du mouvement de la *Listeria*, a été franchi lorsque la bactérie à été remplacée par une bille recouverte de la protéine bactérienne ActA qui permet à *Listeria* d'activer la polymérisation de l'actine à sa surface. De telles billes sont capables de se déplacer à une vitesse comparable à celle des bactéries. Ce système, entièrement *in vitro*, a permis de faire des progrès remarquables sur la compréhension de la polymérisation et de la régulation de l'actine. Il a notamment contribué à quantifier les forces produites par la dynamique de l'actine, à connaître le rôle de certaines protéines régulatrices et à comprendre les mécanismes de propulsion basés sur la polymérisation de l'actine.

Les études antérieures, menées au sein de notre laboratoire, ont utilisé ce système à base de billes afin de mieux comprendre les phénomènes à la base du mouvement cellulaire : la dynamique de polymérisation de l'actine et la brisure de symétrie du réseau d'actine. Dans un premier temps les études utilisaient l'activateur de polymérisation bactérien ActA adsorbé sur une bille, puis il a été remplacé par l'activateur du complexe Arp2/3 présent au niveau du lamellipode d'une cellule, la protéine WASp [Noireaux *et al.* 2000], [Plastino *et al.* 2004a], [Plastino *et al.* 2004b]. On détaillera au paragraphe :2.1.2 la méthode utilisée pour faire croître un gel d'actine autour d'une

bille.

2.1 Les systèmes biomimétiques à base de billes

2.1.1 La propulsion de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est la seule espèce du genre *Listeria*, comportant 7 membres, a être pathogène pour l'homme et l'animal. La maladie, appelée listeriose, se contracte principalement par l'absorption d'aliments contaminés et peut engendrer de sérieux troubles allant jusqu'à la mort. En effet, la bactérie est capable de se multiplier même à basse température, comme à 4°C : température utilisée couramment pour la conservation des aliments. Les personnes les plus vulnérables sont les fœtus, les nouveau-nés ou encore les personnes immunodéficientes [Schlech 2000]. En Europe, la maladie reste encore mortelle dans 20% des cas [ESFA 2009] ce qui explique l'importance accordée à l'étude de ce pathogène. Cependant, même si l'intérêt initial était sûrement médical, ces études ont aussi abouti à la compréhension de la dynamique de polymérisation de l'actine.

Listeria monocytogenes est une bactérie cylindrique de 1,5 à 2 µm de long pour 0,6 µm de large. Son processus d'infection et de propagation au sein des cellules nécessite peu de protéines et se divise en plusieurs étapes :

L'internalisation de la *Listeria monocytogenes* est rendue possible par les macrophages qui sont capables d'en phagocyter jusqu'à une vingtaine. Cependant, *Listeria* est aussi capable de provoquer son entrée au sein de cellules non phagocytaires grâce à deux protéines qu'elle exprime à sa surface. Les internalines A lui permettent de s'attacher à la membrane alors que les internalines B sont responsables de son internalisation. *Listeria* se trouve alors enfermée dans une vacuole. La lyse de la vacuole est donc nécessaire pour que la bactérie se trouve en contact avec le cytosol de la cellule infectée. Pour ce faire la *Listeria* produit une toxine formant des pores, la listeriolysine O ainsi que deux phospholipases C qui lui permettent de s'échapper de la vacuole en un peu plus de 30 minutes [Dabiri *et al.* 1990]. Rapidement après sa libération au sein du cytosol, la bactérie se multiplie en se divisant toutes les heures environ. En plus de proliférer, *Listeria* est capable de détourner une partie de la machinerie cellulaire, liée à l'actine, afin d'activer la polymérisation de l'actine à sa surface et ainsi de pouvoir se propulser jusqu'à 1,5 µm/min [Dabiri *et al.* 1990]. Ce réseau d'actine, généré à la surface de la bactérie, croît constamment et prend une forme de comète qui est capable de produire suffisamment de force pour déformer la membrane plasmique vers l'extérieur et permettre à la bactérie de pénétrer mécaniquement dans une cellule voisine sans passer par le milieu extra-cellulaire où elle pourrait être détectée par le

système immunitaire (FIG :2.1).

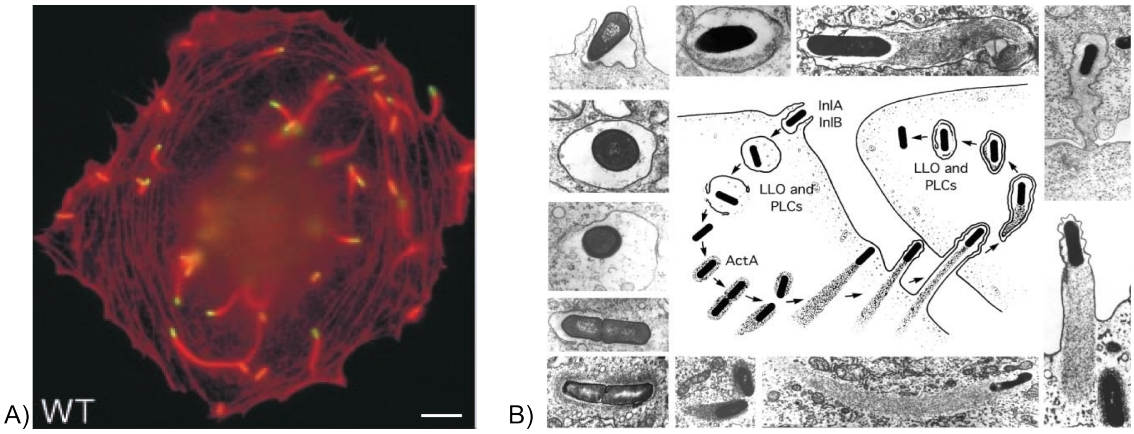


FIGURE 2.1 – A) Observation au microscope à fluorescence de *Listeria* se propulsant à l'aide d'actine au sein d'une cellule infectée PtK2 depuis 3,5 h. L'actine est marquée par de la phalloïdine en rouge et la bactérie en vert, d'après [Skoble *et al.* 2001]. Echelle :10 µm. B) Représentation schématique du cycle de contamination de *Listeria* entourée d'images en microscopie électronique correspondant à chaque étape. Sont indiquées les différentes protéines bactériennes impliquées dans l'internalisation (InlA et InlB : internalines A et B), dans la lyse de la vacuole (LLO et PLCs : Listeriolysine O et les Phospholipases C), dans la polymérisation de la comète d'actine (ActA), d'après [Portnoy *et al.* 2002] et adapté de [Tilney & Portnoy 1989].

Le recrutement des monomères d'actine est rendu possible à la surface de *Listeria* par une seule protéine : ActA. Elle lie l'actine monomérique et induit sa nucléation en activant le complexe Arp2/3. En moins d'une heure, la bactérie est capable de former une comète d'actine. Si l'on regarde les ordres de grandeur on se rend compte que le système composé de la bactérie (dont la longueur L correspond au µm et la vitesse de déplacement est de l'ordre du µm/s) dans le cytoplasme suit les règles de la physique à bas nombre de Reynolds :

$$R_e = \frac{\rho V L}{\eta} \; Soit \; R_e \approx 10^{-6} \tag{2.1}$$

avec $\rho_{eau} = 10^3$, $\eta_{eau} = 10^{-3}\, Pa.s$ respectivement la masse volumique et la viscosité de l'eau, ce qui signifie que les forces visqueuses dominent. Autrement dit, dès que la taille de la comète d'actine, à l'arrière de la bactérie, devient plus grande que la bactérie, la polymérisation de nouveaux monomères d'actine engendre un déplacement de la bactérie alors que la comète reste immobile. Si l'on pouvait instantanément arrêter la polymérisation de l'actine, le régime inertiel durerait moins d'une microseconde et ne

permettrait à la bactérie d'avancer que de 0,1 Å. Sans polymérisation il n'y a donc plus de déplacement de la bactérie [Purcell 1977].

2.1.2 De *Listeria monocytogenes* à la bille

La *Listeria* peut se déplacer, une fois qu'elle a pénétré dans le cytoplasme, mais ce mouvement peut aussi être observé dans un système plus minimaliste où la bactérie est placée dans un extrait cellulaire. De cette observation a émergé l'idée de faire varier la composition de ces extraits cellulaires afin de déterminer le mélange minimal permettant à la bactérie de produire un mouvement. *In vivo*, différentes techniques de marquage ont servi à mettre en évidence la présence de plusieurs protéines, autres que l'actine, au sein des comètes telle que l'α-actinine ou encore la tropomyosine. Cependant, rien ne permettait d'en déduire leur rôle ou la nécessité de leur présence dans la polymérisation de ce réseau d'actine. Ces études, à base d'extraits cellulaires, ont montré que seulement trois composants étaient indispensables à la propulsion de la bactérie (ie, à la polymérisation d'un réseau d'actine). Le mélange minimal doit contenir le complexe Arp2/3 qui est recruté par ActA, une protéine qui permet la dépolymérisation telle que la cofiline mais aussi une protéine coiffante [Loisel *et al.* 1999]. D'autres études, plus récentes, ont démontré qu'il n'est en réalité pas essentiel d'avoir de la cofiline dans le mélange biochimique pour produire une propulsion de bille.

Il est encore possible de simplifier le système en remplaçant la bactérie par une bille de polystyrène recouverte de la protéine ActA (FIG :2.2). On s'affranchit ainsi de la *Listeria*, tout en contrôlant en plus des concentrations en protéines, la géométrie du support de polymérisation [Cameron *et al.* 1999], [Noireaux *et al.* 2000], [Carlier *et al.* 2003]. L'obtention d'une comète d'actine se fait en plusieurs étapes que l'on peut résumer par [van der Gucht *et al.* 2005] :

- Un gel croît de façon uniforme autour d'une bille recouverte d'activateur. La nucléation de l'actine a uniquement lieu à la surface de la bille. Au fur et à mesure que l'actine polymérise la couche externe, anciennement polymérisée, s'étire sous l'effet de l'apparition de la nouvelle couche.
- La contrainte dans le réseau d'actine augmente au fur et à mesure que la couche d'actine s'éloigne de la bille. Lorsque cette contrainte devient trop importante le réseau d'actine se brise et se relaxe du côté opposé à la rupture. C'est ce que l'on appelle la brisure de symétrie, qui donne naissance à une comète d'actine.

Ces expériences reproduisent alors un comportement biologique : il s'agit d'un système reconstitué sur lequel chaque paramètre peut être modifié et dont la modification peut être caractérisée. C'est le principe même du biomimétisme. Que ce soit le réseau d'actine créé par la bactérie, ou celui reproduit avec la bille (FIG :2.2 et FIG :1.4), ils

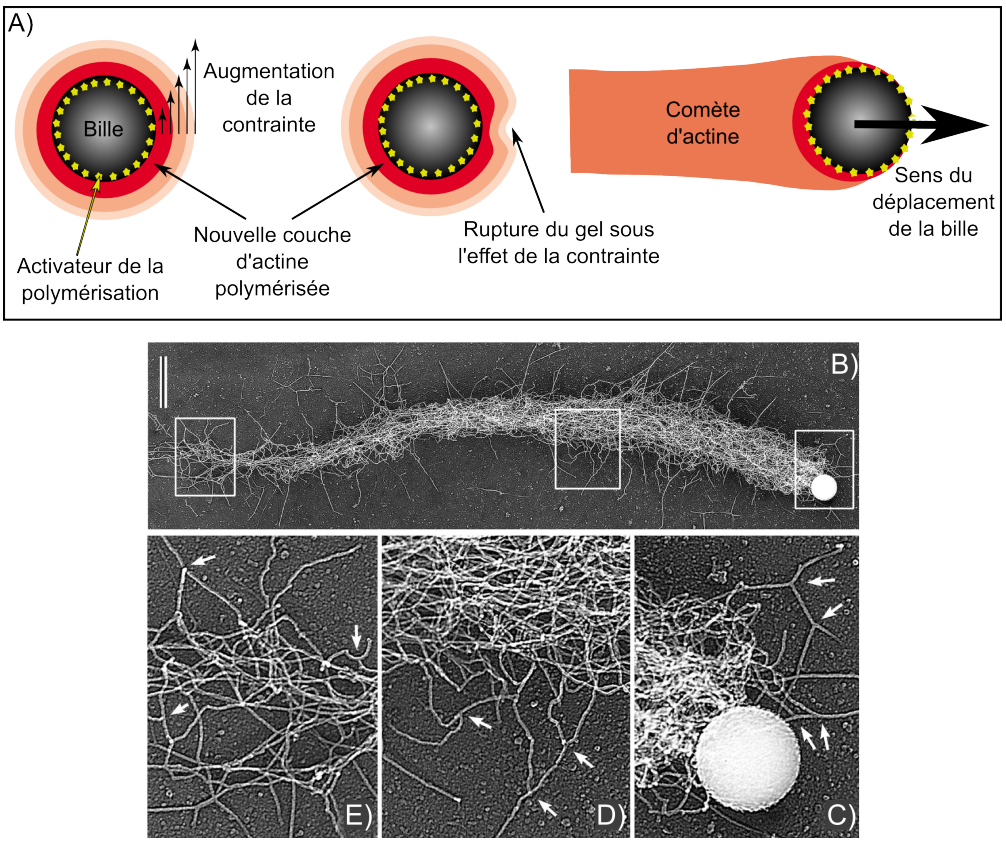


FIGURE 2.2 – A) Schéma des étapes de la croissance d'un réseau d'actine à la surface d'une bille puis de la brisure de symétrie qui mènent à la formation d'une comète d'actine capable de propulser la bille, d'après [Plastino & Sykes 2005]. B) Comète d'actine assemblée par une bille recouverte d'ActA et placée dans de l'extrait d'œuf de *Xenopus*. C-E) Agrandissement des régions encadrées en B). Les flèches indiquent des jonctions en "Y" présentes dans toute la comète. On remarquera que ce réseau dendritique ressemble à celui que l'on observe au front de migration des cellules. La visualisation est faite au microscope électronique, d'après [Cameron *et al.* 2001]. Echelle :1 µm.

reproduisent tous les deux la structure et la dynamique du réseau d'actine des filopodes et lamelliopdes, des zones se trouvant au front de migration des cellules en mouvement. Ces zones sont connues pour engendrer elles aussi des forces suffisantes à la reptation. Ainsi, le système simplifié de la *Listeria* est aussi un outil de choix pour l'étude de la croissance et de la production de forces par la dynamique de l'actine.

2.1.3 Caractérisation mécanique et biochimique de la brisure du cortex d'actine

De nombreuses études ont été menées sur la propulsion des billes par la polymérisation de l'actine. Ce système permet de moduler fortement chacun des constituants impliqué dans la polymérisation de l'actine mais aussi de quantifier les effets de ces changements. On peut utiliser des extraits cellulaires ou un mélange purifié de protéines, adsorber à la surface de la bille différents activateurs, travailler avec des protéines mutantes, etc., puis mesurer les effets de ces modifications sur la croissance du réseau d'actine, sa mécanique, la formation de la comète ou encore la vitesse de déplacement de la bille pour ne donner que quelques exemples.

Certaines de ces études ont été menées au sein de notre laboratoire (Annexe A, pour la plus récente). En 2004, l'utilisation de ce système biomimétique a permis de mesurer par micromanipulation les forces générées par l'actine durant la propulsion de la bille mais aussi d'estimer le module élastique de la comète d'actine à 10^3 Pa [Marcy *et al.* 2004]. Plus récemment, l'équipe s'est penchée sur le lien entre la croissance du réseau d'actine et l'initiation du mouvement afin de comprendre sous quelles conditions l'organisation microscopique d'un réseau branché d'actine pouvait entrainer et maintenir un mouvement. Pour ces travaux, le réseau d'actine polymérise à partir de billes en polystyrène maintenues dans une solution contenant un mélange minimal de protéines purifiées telles que l'actine-G, le complexe Arp2/3 et la CP (Annexe D). Les propriétés mécaniques du réseau d'actine, à travers son organisation microscopique, sont modifiées en faisant varier les concentrations en protéines. Il est alors possible de modifier la morphologie du réseau en contrôlant son initiation, sa vitesse de croissance, sa réticulation et la force qu'il produit. Moduler la biochimie de la polymérisation de l'actine peut engendrer une perte de l'enchevêtrement du réseau qui est alors incapable d'accumuler de la tension. Ce travail, à l'aide de simulations numériques, a permis de mettre en évidence un lien étroit entre la biochimie et la physique de la croissance du réseau d'actine, phénomène qui gouverne l'accumulation de forces à la base du mouvement cellulaire [Kawska *et al.* 2012].

2.1.4 La diversité des systèmes biomimétiques

Les systèmes biomimétiques, pour l'étude de la polymérisation de l'actine, se sont diversifiés, ils utilisent de nombreuses techniques expérimentales (FIG :2.3). Ainsi, remplacer les billes de polystyrène par une goutte d'huile permet, par la mesure de la déformation que subit la goutte, l'étude des contraintes mécaniques exercées par la polymérisation de l'actine [Boukellal *et al.* 2004]. L'utilisation d'un bâtonnet, quant à lui, va permettre de former une structure réticulée à 2 dimensions propice à l'étude du mouvement produit par un lamellipode [Achard *et al.* 2010]. Ou encore, la microfabrication permet de construire des motifs micrométriques qui peuvent former des faisceaux d'actine parrallèles ou anti-parallèles sur lesquels on peut ensuite disséquer l'activité de moteurs moléculaires comme la myosine II [Reymann *et al.* 2012]. En dernier lieu, il existe aussi les liposomes, qui sont des membranes plasmiques artificielles permettant à la fois de mimer le confinement et le support physiologique de polymérisation du cortex d'actine [Pontani *et al.* 2009]. C'est sur ce modèle que mes études ont porté. Le principe de polymérisation sur membrane est très proche de celui utilisé pour les billes : au lieu d'adsorber l'activateur à la surface d'une bille il est attaché par un lien spécifique à un lipide présent dans la membrane. On peut ainsi reproduire un réseau à l'extérieur ou bien à l'intérieur d'un liposome.

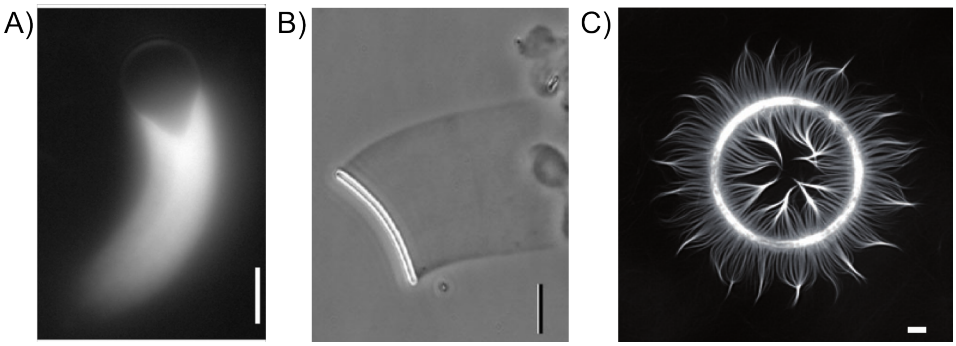


FIGURE 2.3 – A) goutte d'huile recouverte de l'activateur de la polymérisation de l'actine, placée dans un extrait cellulaire de cellules HeLa. L'actine est marquée à l'Alexa et l'observation est faite au microscope fluorescent. Sous la contrainte exercée par l'actine la goutte se déforme, d'après [Boukellal *et al.* 2004]. Echelle :4 µm. B) Bâtonnet de verre recouvert d'un activateur de la polymérisation de l'actine mimant l'extension d'un lamellipode, observé au microscope à contraste de phase d'après [Carlier *et al.* 2003]. Echelle :10 µm. C) Image au microscope fluorescent de filaments d'actine marqués. L'activateur de la polymérisation a été déposé par une technique de micromatriçage en forme d'anneau afin de permettre l'émergence de bundles d'actines [Reymann *et al.* 2010]. Echelle :10 µm.

2.2 Les liposomes

Alors que les surfaces dures miment bien la bactérie *Listeria*, dont la membrane est une couche épaisse, rigide et indéformable de peptidoglycanes elles montrent leurs limites pour l'étude des déformations membranaire. Une étape, vers la mise en place d'un système plus proche de la situation physiologique, consiste à utiliser des membranes modèles et à étudier la manière dont les forces engendrées par le cytosquelette contrôlent leurs déformations. Le cytosquelette peut être soit confiné, comme dans la cellule, soit la membrane peut être étudiée comme un système déformable sur lequel on ajoute un à un les éléments biochimiques liés à la contraction cellulaire. Le deuxième cas de figure, comme nous le verrons plus tard au chapitre 5, permet de caractériser de manière indépendante la contribution de chacun des acteurs du cytosquelette d'acto-myosine, impliqués dans la génération de forces. Avant de rentrer dans ce degré de complexité, on s'intéressera simplement aux membranes. On détaille quelques unes de leurs propriétés (géométriques, mécaniques), les différentes méthodes de formation, avec leurs avantages et inconvénients, et l'on donne aussi quelques exemples d'utilisations de ces membranes, basées sur le liposome. On commence par présenter rapidement les lipides qui sont l'élément de base d'une membrane.

Il existe de nombreux types de lipides, mis en solution aqueuse ces derniers sont capables de s'auto-organiser en fonction de leur géométrie. Il est possible de prévoir la structure que les lipides vont former en solution en fonction de leur rapport d'aspect. Il s'agit d'un paramètre déterminé par la structure chimique du lipide (nombre de queues, taille de la tête) et permettant de caractériser sa géométrie conique, cylindrique ou conique inversée comme présenté FIG :2.4. Des lipides de forme cylindrique formeront une bicouche lipidique plane alors que des lipides coniques tronqués auront tendance à déformer la bicouche en formant une courbure par leur simple présence.

Les membranes biologiques sont asymétriques. Même si la plupart des lipides sont présents à la fois dans les deux bicouches, leur distribution reste différente [Rothman & Lenard 1977] et [Devaux & Morris 2004]. Cependant dans les études menées sur des systèmes de membrane modèle, les bicouches lipidiques sont généralement identiques. Cette symétrie des couches lipidiques n'empêche pas pour autant la membrane de rester un milieu fluide dans lequel les lipides peuvent encore diffuser, tourner, passer d'une mono-couche à une autre (phénomène dit de "flip-flop").

Les mélanges lipidiques couramment utilisés pour mimer une membrane plasmique sont à base de DOPC (1,2-dioleoylphosphatidyl choline) ou d'EPC (L-α-phosphatidylcholine). On préfèrera utiliser l'EPC pour les techniques de préparation de liposomes que nous avons utilisées. A cette base vient s'ajouter d'autres lipides fluorescents pour permettre l'observation (BodipyFL C5, Texas Red DHPE), du cholestérol,

Lipid	Critical packing parameter $v/a_0 l_c$	Critical packing shape	Structures formed
Single-chained lipids (surfactants) with large head-group areas: *SDS in low salt*	$< 1/3$	Cone	Spherical micelles
Single-chained lipids with small head-group areas: *SDS and CTAB in high salt, nonionic lipids*	1/3-1/2	Truncated cone	Cylindrical micelles
Double-chained lipids with large head-group areas, fluid chains: *Phosphatidyl choline (lecithin), phosphatidyl serine, phosphatidyl glycerol, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid, sphingomyelin, DGDG[a], dihexadecyl phosphate, dialkyl dimethyl ammonium salts*	1/2-1	Truncated cone	Flexible bilayers, vesicles
Double-chained lipids with small head-group areas, anionic lipids in high salt, saturated frozen chains: *phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine + Ca^{2+}*	~1	Cylinder	Planar bilayers
Double-chained lipids with small head-group areas, nonionic lipids, poly *(cis)* unsaturated chains, high *T*: *unsat. phosphatidyl ethanolamine, cardiolipin + Ca^{2+} phosphatidic acid + Ca^{2+} cholesterol, MGDG[b]*	> 1	Inverted truncated cone or wedge	Inverted micelles

[a] DGDG, digalactosyl diglyceride, diglucosyl diglyceride.
[b] MGDG, monogalactosyl diglyceride, monoglucosyl diglyceride.

FIGURE 2.4 – Présentation schématique des différentes formes de lipides, rangées en fonction du type de tête et de queue qu'ils possèdent. Le lien est fait entre le rapport d'aspect et leur structure chimique grâce à leur rapport d'aspect qui correspond au volume v occupé par un lipide divisé par a_0 et l_c représentant respectivement la surface de la tête lipidique et la longueur de leur chaîne. L'organisation adoptée à l'échelle mésoscopique est indiquée à droite. D'après [Israelachvili 1992]

des lipides permettant de mimer une interaction à une protéine chimère (NTA-Ni, PEG-biotine), ou les lipides se liant naturellement à un agent pathogène (GB_3) et enfin des mélanges extraits de cellules (Total Brain Extract, PiP_2).

2.2.1 Les différents types de vésicules

Nous avons formé différents types de vésicules au laboratoire. Pour des tests de co-sédimentation (intéraction protéines/membranes) nous avons utilisé de petites vésicules d'environ 50 nm de diamètres, alors que pour mimer une membrane cellulaire nous avons fabriqué des vésicules de taille comparable à celle de la cellule. On classe les vésicules en trois catégories en fonction de la taille de leur diamètre, le terme unilamellaire faisant référence à une seule bi-couche lipidique :

Les Small Unilamellar Vesicles (SUVs) ont un diamètre compris entre 40 et 100 nm :
Les SUVs sont obtenues par séchage sous vide d'un film de lipides que l'on réhydrate ensuite par une solution tampon. La suspension est soumise à une sonication durant une nuit ou bien extrudée à l'aide d'un filtre de très petite taille afin de forcer mécaniquement la formation des SUVs. Une fois produites les SUVs peuvent être conservées plusieurs mois à −20°C. Elles ne nécessitent pas de précautions particulières lors des pipetages et centrifugations. La taille des SUVs étant calibrée par le filtre elles sont généralement employées pour des études quantitatives en biochimie (co-sédimentation, électrophorèse).

Les Large Unilamellar Vesicles (LUVs) ont un diamètre compris entre 100 nm et 1 µm :
Dans ce cas aussi les LUVs sont obtenues par la réhydratation d'un film de lipides, à l'aide d'une solution aqueuse. Le mélange est ensuite vortexé puis réchauffé dans un bain marie à 100°C. Enfin la suspension est filtrée par une extrudeuse au travers de pores de l'ordre de 100 à 200 nm. La taille des pores du filtre est ce qui détermine la taille finale des LUVs.

Les Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) ont un diamètre compris entre 1 µm et 100 µm :
Plusieurs techniques permettent d'obtenir des GUVs. La plus simple consiste à hydrater un film de lipides dans un tampon aqueux. Spontanément les lipides vont s'auto-assembler et former, parmi d'autres structures telles que des vésicules multilamellaires, des liposomes (ou vésicules géantes). La quantité de liposomes restera cependant assez faible face aux structures multilamellaires ce qui explique que l'on préfère utiliser en général d'autres méthodes (décrites à la section suivante). Quelle que soit la méthode choisie le principe reste quasiment toujours le même (FIG :2.5). Il y a une étape

d'hydratation des lipides induisant leur auto-organisation, une autre étape consiste à faire gonfler les structures formées par les lipides et enfin une dernière étape permet la fusion des structures lipidiques par coalescence.

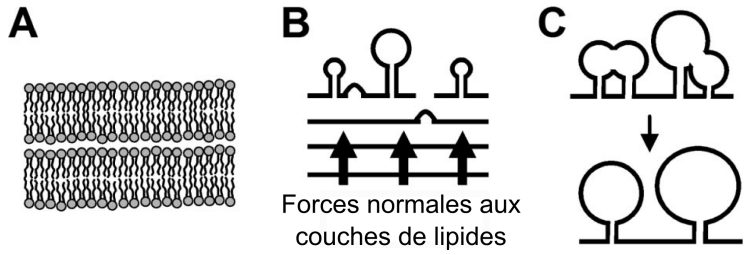


FIGURE 2.5 – Schématisation des trois étapes essentielles à la formation des GUVs (arrangement en bicouche/croissance/coalescence), seul leur ordre d'intervention dans le processus de formation sera modifié. A) Assemblage des lipides en bicouches pouvant se superposer. B) Croissance des liposomes induite par une force perpendiculaire aux bicouches de lipides. C) Fusion de liposomes adjacents par coalescence, d'après [Horger *et al.* 2009].

2.2.2 Techniques de formation des GUVs

Dans cette partie seront abordées les différentes techniques de formation des GUVs. Le modèle de la GUV étant celui qui a été privilégié durant cette thèse, étant donné que sa taille micrométrique la rend facilement observable et proche de la taille d'une cellule eucaryote.

La croissance par l'hydratation d'un gel

Cette méthode récente consiste à faire un gel quasiment sec d'agarose, dans lequel des lipides sont incorporés, que l'on réhydrate ensuite (FIG :2.6) [Horger *et al.* 2009]. Cette hydratation entraîne un gonflement du gel et en même temps la formation de liposomes à sa surface. La solution utilisée lors de l'étape de réhydratation peut contenir des sels ce qui permet d'ajouter des protéines, sans les dénaturer, qui peuvent se retrouver piégées dans les liposomes [Tsai *et al.* 2011].

Cette technique permet de fournir à la fois une grande quantité de GUVs, même si certains liposomes restent attachés à la surface du film d'agarose, et d'encapsuler des protéines. Cependant l'encapsulation de protéines reste assez hétérogène, l'efficacité de la technique est très dépendante de l'expérimentateur et l'on retrouve des traces

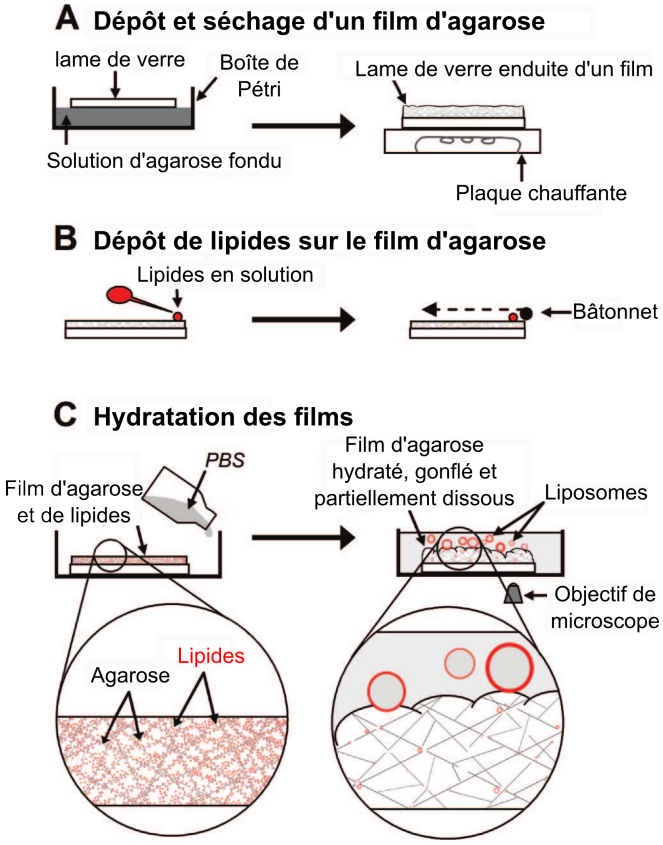


FIGURE 2.6 – Formation de liposomes par gonflement d'un gel d'agarose. A) Une fine couche d'agarose est déposée puis séchée sur une lame de verre. B) Une solution de lipides est déposée sur le film d'agarose de manière à pénétrer dans l'ensemble du polymère. C) L'hydratation de film d'agarose-lipides permet son gonflement et la formation de liposomes à sa surface, d'après [Horger *et al.* 2009].

d'agarose dans la solution aqueuse. D'autres gels, comme l'alcool polyvinylique (PVA), sont maintenant utilisés à la place de l'agarose dans le but d'optimiser le détachement des GUVs de leurs surfaces et de diminuer la contamination de la solution d'hydratation par la dissolution des polymères formant le gel [Weinberger *et al.* 2013].

L'électroformation

L'électroformation est une autre technique permettant un très bon rendement de liposomes unilamellaires. Cette méthode mise au point par Angelova en 1986 est extrêmement bien caractérisée depuis [Angelova & Dimitrov 1986] et [Mathivet *et al.* 1996]. Les GUVs sont formées par hydratation d'un dépôt de lipides en présence d'un champ électrique, cependant la solution de réhydratation doit être non ionique. Il s'agit d'une technique couramment utilisée durant ma thèse tant qu'il n'y a pas besoin d'encapsuler de protéines. On présente le protocole en Annexe E.

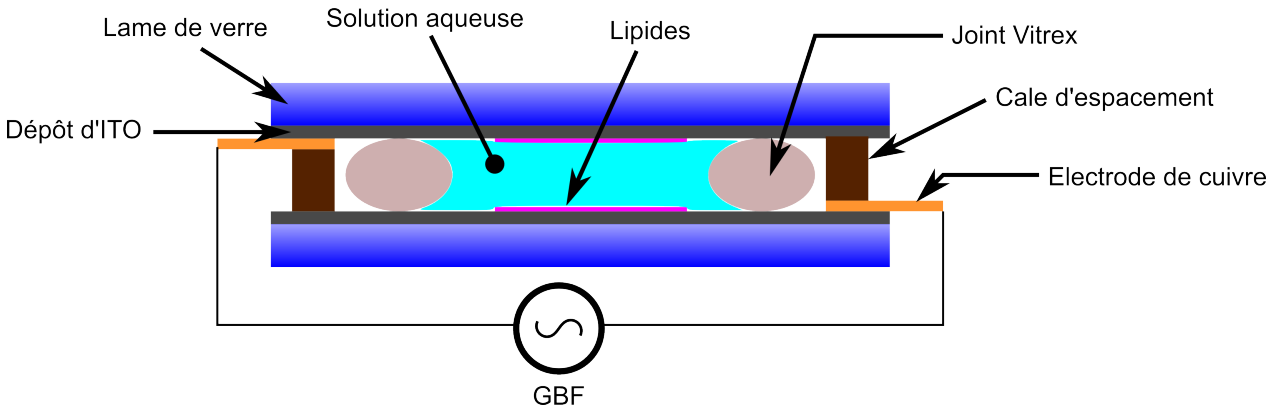


FIGURE 2.7 – Schéma de la chambre d'électroformation. Deux lames de verre recouvertes d'un revêtement d'ITO sont placées en face l'une de l'autre. Une fine couche de lipides déshydratés est déposée sur le revêtement d'ITO. Une solution non ionique est ensuite incorporée dans la chambre scellée à la pâte vitrex. Deux électrodes de cuivre permettent de relier chaque face conductrice de la chambre à un GBF qui délivre un signal de 10 Hz à $1V_{pp}$.

Cette technique permet d'obtenir rapidement un très grand nombre de liposomes unilamellaires. Cependant la méthode de formation ne permet pas d'encapsuler des protéines. En effet, la présence du champ électrique ainsi que le manque de sels dans la solution de gonflement sont deux paramètres qui détériorent les protéines. De plus les liposomes une fois formés possèdent la même solution intérieure que celle dans laquelle ils se trouvent. Si l'on souhaite modifier la solution extérieure il faut procéder par dilutions successives afin d'éviter tout choc osmotique. Cette dilution étant possible grâce au très

bon rendement de la méthode, même diluée par un facteur 100 il y aura suffisamment de liposomes dans le champ d'un microscope.

L'émulsion inverse

Contrairement aux autres procédés présentés ci-dessus, la solution intérieure peut être différente de celle à l'extérieure des liposomes, à condition qu'elles aient la même osmolarité, et les deux mono-couches de lipides sont assemblées indépendamment l'une de l'autre [Pautot *et al.* 2003a]. L'émulsion inverse est la méthode utilisée durant ma thèse lorsqu'il est nécessaire d'encapsuler des protéines ou lorsque le feuillet interne et le feuillet externe d'un liposome possèdent une composition lipidique différente. Cette technique a été mise au point par S. Pautot en 2003 [Pautot *et al.* 2003b]. On résume rapidement les différentes étapes de l'émulsion inverse utilisées durant cette thèse (FIG :4.8), directement inspirées de [Pontani *et al.* 2009], le protocole complet étant donné en AnnexeE :

- Dans un premier temps les lipides sont dissous dans de l'huile minérale. Ce mélange de lipides est ensuite utilisé pour former une émulsion. Les lipides s'organisent spontanément à la surface des gouttes de solution intérieure et stabilisent l'émulsion. Il est possible d'ajouter des protéines à la solution interne.

- En parallèle, on dépose au-dessus de la solution extérieure une fine couche du mélange d'huile/lipides de manière à ce que les lipides s'organisent une fois encore spontanément à l'interface entre les deux solutions non miscibles.

- L'émulsion est délicatement déposée au-dessus de la couche huile/lipides qui est elle-même au dessus de la solution extérieure. Par centrifugation on force le passage des gouttes de solution intérieure à travers l'interface, ce qui permet de les recouvrir d'une deuxième couche de lipides. La solution extérieure contient alors des vésicules unilamélaires géantes que l'on nomme liposomes.

Pour s'assurer de la sédimentation des liposomes, on joue sur une différence de densité entre la solution interne et la solution externe. En ajoutant du sucrose à la solution extérieure et du glucose à la solution interne les liposomes sont plus denses et sédimentent au fond du tube d'Eppendorf. Ce principe permet aussi d'observer plus facilement les liposomes au microscope à contraste de phase. Cependant pour prévenir tout phénomène d'explosion ou d'attachement des liposomes une fois qu'ils se déposent sur la lame d'observation on passive toutes les surfaces en les incubant préalablement dans une solution à 5 mg/mL de β-caséine.

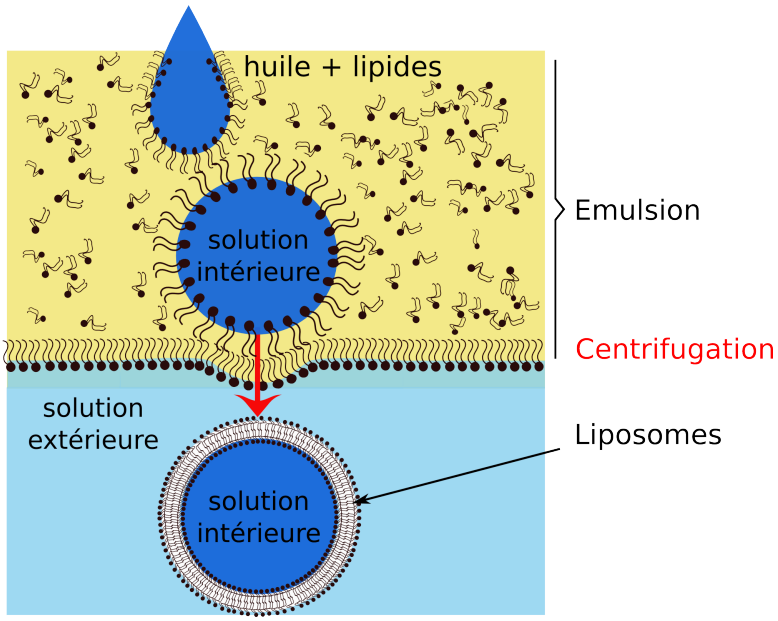


FIGURE 2.8 – Schéma du principe de l'émulsion inverse. Une émulsion d'eau dans l'huile est tout d'abord formée puis déposée au-dessus d'une interface plane recouverte de lipides. Par centrifugation les micelles traversent cette interface et se recouvrent d'une deuxième couche de lipides. Une fois qu'ils se trouvent dans la solution extérieure ils possèdent deux couches de lipides : on forme des liposomes.

Cette technique bien qu'elle permette à la fois d'encapsuler les protéines et de former des liposomes de différentes tailles ou/et asymétriques est difficile à réaliser. Son rendement dépend très fortement de l'expérimentateur, des lipides utilisés et des protéines que l'on souhaite encapsuler. Plus le système est complexifié et plus le rendement de la formation diminue. Toutefois, elle reste l'une des seules méthodes qui permet d'avoir autant de degrés de liberté sur la formation des liposomes. D'autres méthodes, proches de celle-ci, ont vu le jour récemment afin de rendre l'émulsion inverse moins dépendante de l'expérimentateur et plus automatique grâce à des systèmes de chambres microfluidiques ou de centrifugation [Stachowiak *et al.* 2008], [Abkarian *et al.* 2011]. Quoi qu'il en soit et pour toute méthode utilisée, il faut avoir conscience que changer un seul paramètre engendre automatiquement une modification du protocole et du rendement allant souvent de paire avec des jours et des jours d'expérimentation pour celui qui s'aventure dans cette voie.

2.2.3 Le liposome utilisé comme milieu de réaction : les bioréacteurs

Une des questions biologiques qui reste encore en suspens est de savoir quels composants sont nécessaires et suffisants à la fabrication d'un système cellulaire capable de s'auto-dupliquer. Dans une approche dite "bottom-up" l'un des points clés à franchir pour créer une cellule artificielle est de reproduire deux caractéristiques contradictoires de la membrane plasmique : être capable de renfermer un milieu mais aussi de permettre des échanges (d'énergie, de nutriments) avec le milieu extérieur afin d'avoir un système dynamique. Cette limitation a été franchie en détournant l'utilisation d'une toxine du *staphylococcus aureus*, l'α-hémolysine, qui permet de rendre une bicouche lipidique perméable à certains composants biochimiques. Même si l'ajout de cette toxine à la membrane des liposomes est couramment utilisé, aucune caractérisation de son incorporation, ou des échanges entre la solution intérieure et celle extérieure n'avait été faite. Il s'agit du premier travail effectué durant cette thèse et présenté au chapitre 3.

Le liposome utilisé comme réacteur à protéines

En première approximation la cellule est une simple structure isolée du milieu extérieur par une membrane et capable de synthétiser des protéines. Ce sont ces deux caractéristiques qui ont d'abord été reproduites *in vitro* par V. Noireaux [Noireaux & Libchaber 2004]. Les liposomes sont tout d'abord formés par émulsion inverse, ce qui permet d'encapsuler de l'extrait cellulaire et un plasmide codant l'α-hémolysine. Alors qu'en solution la production de protéines s'arrête après deux heures, l'utilisation de l'encapsulation et de l'α-hémolysine permet d'avoir un système "quasi-fermé" qui produit des protéines durant plusieurs jours. Le simple ajout d'un plasmide

codant pour l'α-hémolysine permet au réacteur de produire cette toxine de 33 kDa, soluble dans l'eau. Lorsque sa concentration augmente au-dessus de 100 nM elle s'adsorbe sur la paroi interne du liposome de manière non spécifique. L'assemblage à la membrane de sept monomères permet de former la protéine complète qui agit alors comme un pore passif transmembranaire. La toxine, une fois formée, laisse passer toutes les protéines dont la masse est inférieure à 3 kDa, cette taille critique étant directement liée à la structure du canal interne qu'elle forme de 28 Å de diamètre (FIG :2.9). En détournant à notre avantage l'utilisation de cette toxine, il est alors possible de permettre le passage d'énergie, d'acides nucléiques ou encore de sels, indispensables à la synthèse protéique, au sein du liposome.

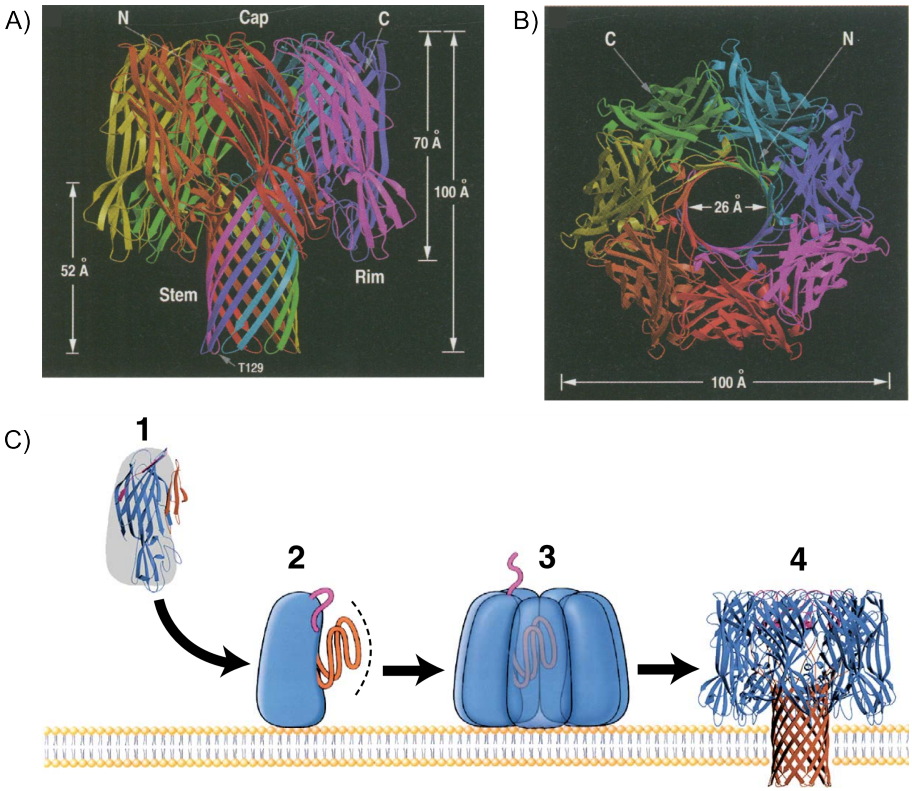


FIGURE 2.9 – Représentation de la structure de l'α-hémolysine et de son mode d'incorporation dans une bicouche lipidique. A) Vue d'une coupe sagittale selon l'axe long de l'heptamère. La structure en champignon du complexe mesure environ 100Å de haut. B) Vue du dessus de la structure d'envrion 100Å de large. Le canal central forme un pore qui mesure 26Å. Chaque couleur représente un des sept monomères, d'après [Song *et al.* 1996] C) Mécanisme d'assemblage du complexe à la membrane, d'après [Montoya & Gouaux 2003].

Le liposome utilisé pour reconstruire le cortex cellulaire

Une approche similaire a été utilisée pour reproduire, de manière très contrôlée, le cortex d'actine à l'intérieur d'un liposome. Dans un premier temps un liposome est formé par émulsion inverse de manière à encapsuler les protéines nécessaires à la polymérisation de l'actine. Cependant, pour contrôler le départ de la polymérisation, toute la procédure d'encapsulation est effectuée à 4°C et l'on omet aussi d'ajouter deux composants essentiels à la formation de l'actine-F : l'ATP et les sels. Ces liposomes sont ensuite déposés dans une solution extérieure qui contient à la fois l'ATP et les sels puis la polymérisation est enfin déclenchée en injectant *in situ* l'α-hémolysine. Après quelques minutes, le temps pour la toxine de s'incorporer dans la membrane des liposomes, les sels et l'ATP vont pouvoir franchir la membrane et déclencher la polymérisation d'un cortex [Pontani *et al.* 2009].

Composition lipidique

Les liposomes, que j'ai aussi utilisés dans mes travaux, sont composés de 90% d'EPC et de 10% de lipides DOGS-NTA-Ni. L'EPC est un mélange de phospholipides portant une tête phosphatidylcholine mais dont la taille des queues hydrophobes varie (FIG : 2.10). Ce mélange de lipides utilisé pour mimer une membrane plasmique permet d'avoir un très bon rendement par émulsion inverse. Les 10% molaire de lipides nickel sont quant à eux ajoutés pour permettre de fonctionnaliser la membrane en utilisant le motif NTA-Ni comme agent de liaison à un motif histidine, porté par une protéine nécessaire à la polymérisation de l'actine. La solution interne du liposome contient déjà toutes les protéines nécessaires à la polymérisation de l'actine.

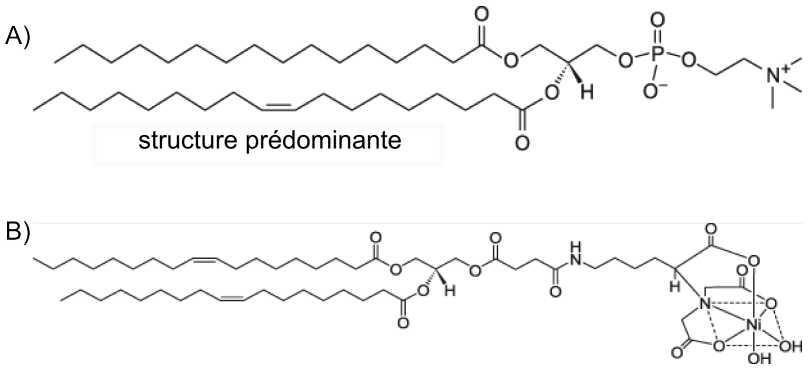


FIGURE 2.10 – A) Structure prédominante de L-α-phosphatidylcholine (Egg PC). B) Structure du lipide nickel, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl] (nickel salt), utilisé pour fonctionnaliser la membrane du liposome. D'après http ://avantilipids.com

La formation du cortex

Afin de s'assurer que la polymérisation de l'actine n'a lieu qu'à la membrane, le fragment protéique de l'activateur de la nucléation de l'actine est modifié de manière à contenir un motif histidine permettant son ancrage sur les lipides nickel. Le mélange minimal encapsulé dans le liposome contient le complexe Arp2/3 qui peut donc être activé. Ce n'est qu'avec l'ajout de l'α-hémolysine qui permet à l'ATP et aux sels de pénétrer dans le liposome que la réaction de formation d'un réseau réticulé d'actine sur la membrane interne du liposome interviendra.

2.2.4 Le liposome "inversé", utilisé comme support de réaction

Pour approfondir les effets de la contraction d'un réseau d'actine par la myosine sur le changement de forme cellulaire des études, similaires à celles effectuées sur des billes, ont été menées sur des liposomes de la taille d'une cellule. Contrairement au système de billes en polystyrène, pour lesquelles les surfaces rigides ne se déforment pas sous l'effet de forces de l'ordre du piconewton, les membranes de liposomes vont elles subir des déformations sous l'effet des contraintes mécaniques.

D'un point de vue microscopique les contraintes mécaniques lors de la contractilité cellulaire sont générées par la myosine, qui est capable de se lier aux filaments d'actine du cytosquelette et exerce des forces sur ce réseau tout en consommant de l'ATP. Afin de décortiquer les mécanismes physiques responsables du changement de forme cellulaire, une étude menée au sein du laboratoire utilise un réseau d'actine attaché à la surface externe d'un liposome sur lequel est ajouté la myosine. Ce système permet en effet de disséquer le rôle des moteurs moléculaires, de l'attachement du réseau d'actine à la membrane et de la réticulation de ce réseau. Cette étude met en évidence deux types de comportements du système biomimétique lors sa contraction (FIG :2.11). Soit le réseau d'actine se rompt et relâche les contraintes mécaniques en déshabillant le liposome, soit la contraction du réseau entraîne une compression puis une implosion du liposome. Le paramètre à l'origine du choix entre ces deux comportements étant la tension du réseau d'acto-myosine qui est déterminée par le nombre de myosines, la connectivité du réseau et son ancrage à la membrane. En effet, l'augmentation du nombre de liens entre le réseau et la membrane, en augmentant la quantité de lipides biotynilés à la membrane du liposome, permet d'augmenter de manière significative l'apparition de l'implosion des liposomes [Carvalho *et al.* 2013].

Bien que le système soit proche de celui des études sur billes, il permet de moduler l'ancrage du réseau d'actine à la membrane et de travailler sur des supports à plus faible rigidité. On accède ainsi à l'observation de phénomènes de déformation encore

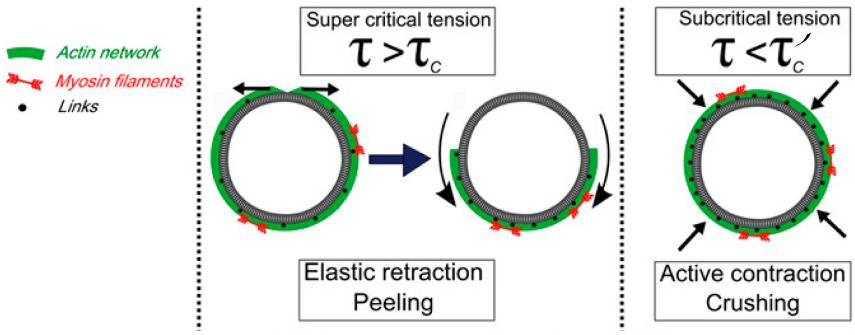


FIGURE 2.11 – Effet de l'ancrage du réseau d'actine à la surface extérieure d'un liposome sur la contraction d'acto-myosine. A) Les myosines en contractant le réseau d'actine augmentent les contraintes mécaniques τ. Si τ dépasse la tension critique de rupture du réseau τ_c, celui-ci se brise et se rétracte de manière élastique ("peeling"). B) Lorsque le réseau est plus fortement attaché à la membrane, la tension induite par la contraction des myosines reste inférieure à τ_c'. Les myosines vont alors comprimer le liposome et le faire imploser ("crushing"). D'après [Carvalho *et al.* 2013].

plus proches de ceux ayant lieu lors de la cytokinèse ou de la mobilité cellulaire. Il s'agit principalement, dans ces travaux, de quantifications biochimiques des phénomènes de contraction. Durant cette thèse nous avons mis au point un nouveau système biomimétique, toujours à base de liposomes, afin de quantifier les contraintes induites par les myosines II. Ce travail sera présenté au chapitre 5.

2.2.5 La physique des membranes

Les bicouches lipidiques, en plus d'être utilisées en biologie pour mimer les membranes, ont aussi intéressé les physiciens. En effet, malgré la multitude de lipides qui constitue une membrane, il est tout de même possible de prévoir son comportement en la modélisant comme un système continu. En 1973, W. Helfrich propose toute une description des membranes et plusieurs expériences afin de caractériser et prédire le comportement de ce nouvel objet d'étude tout en espérant pouvoir transférer ce modèle aux membranes biologiques [Helfrich 1973]. Son modèle est basé sur l'élasticité d'une bicouche lipidique, la fluidité de ce milieu et la propriété d'auto-assemblage des lipides. De cette théorie, à la base de toute la biophysique des membranes, il ressort que dans le cas des liposomes seuls deux paramètres suffisent pour caractériser la membrane qui le constitue : le module de compressibilité χ et le module de courbure κ. Chacun de ces deux termes est associé à une énergie élastique que l'on peut voir comme étant le coût à payer pour étirer/comprimer une membrane (H_{tir}) ou pour la courber (H_{courb}). Ainsi, pour un liposome, lorsque l'on s'intéresse aux énergies mises en jeu lors d'une déformation de sa membrane on peut écrire, en première approximation, l'énergie élastique liée

à cette déformation sous la forme :

$$H = H_{etir} + H_{courb} = \frac{1}{2}\chi(\frac{\Delta A}{A})^2 + \frac{1}{2}\kappa(C - C_0)^2 \tag{2.2}$$

ΔA représente la variation de surface A due à l'étirement/la compression. C correspond à la courbure moyenne de la membrane et C_0 à sa courbure spontanée.

La technique de l'aspiration

Il faudra attendre quelques années pour que le modèle d'Helfrich soit vérifié expérimentalement. Plusieurs techniques ont été inventées pour mesurer les propriétés des membranes. Certaines sont basées sur des mesures de fluctuation de la membrane grâce à l'utilisation de pinces optiques [Betz *et al.* 2009] d'autres, plus mécaniques, utilisent la technique de l'aspiration par une micropipette [Evans & Rawicz 1990].

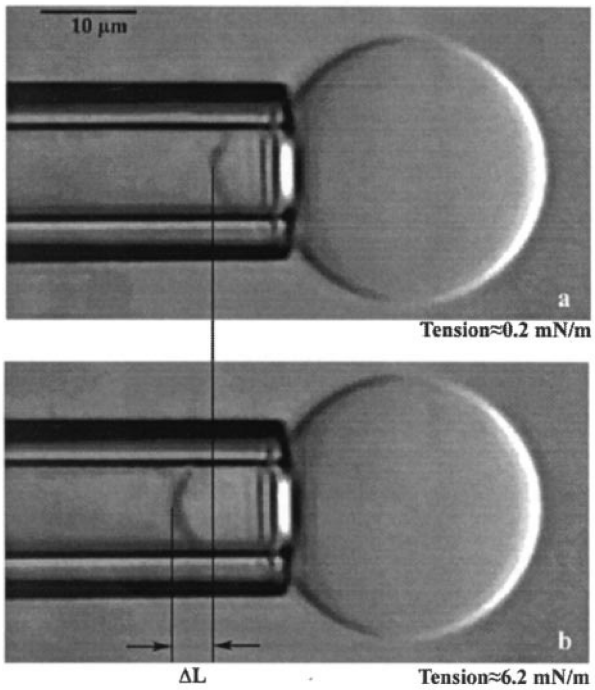


FIGURE 2.12 – Aspiration d'un liposome par une micropipette. Lorsque l'on augmente la différence de pression en passant de a) à b) on peut observer une augmentation de la longueur de la langue. Cette variation est due à l'augmentation de la surface apparente du liposome. D'après [Rawicz *et al.* 2000].

La méthode de la micropipette permet de fixer la tension d'un liposome en l'aspirant

et de mesurer la variation de surface engendrée. La partie du liposome aspirée dans la micropipette épouse la surface intérieure de cette dernière, c'est ce que l'on appelle "la langue" (FIG : 2.12). L'ingéniosité de la méthode réside dans la manière d'appliquer une tension σ à un liposome. Grâce à un tuyau reliant la micropipette à un réservoir d'eau, la loi de l'hydrostatique permet de connaître la pression hydrostatique en sortie de micropipette ΔP en fonction de la différence de hauteur h entre ce réservoir et la chambre d'observation : $\Delta P = \rho g h$, ou ρ représente la masse volumique de l'eau, g l'accélération de pesanteur. Il suffit ensuite d'appliquer la loi de Laplace au liposome maintenu dans la micropipette pour remonter à σ :

$$\sigma = \frac{R_{pip}}{2(1 - R_{pip}/R_{lip})} \Delta P \tag{2.3}$$

R_{pip} et R_{lip} représentent respectivement le rayon de la micropipette et du liposome. La variation de surface ΔA est quant à elle liée à l'évolution de la longueur de "la langue" à l'intérieur de la micropipette. Il ne manque plus qu'à faire ensuite le lien entre la tension et le module de compressibilité :

$$\sigma = \frac{\partial(HA)}{\partial \Delta A} \text{ soit d'après l'équation } 2.2, \ \sigma = \chi(\frac{\Delta A}{A}) \tag{2.4}$$

Cette technique a été très largement utilisée sur des membranes modèles ou biologiques, comme les globules rouges, ou même sur des agrégats cellulaires, permettant de remonter aux paramètres mécaniques de ces objets [Mohandas & Evans 1994], [Manneville *et al.* 2001], [Guevorkian *et al.* 2011] et [Chaigne *et al.* 2013].

L'extrusion de tubes de membrane

Si une force est appliquée perpendiculairement à la surface du liposome il est possible d'en extraire un tube, ceci grâce à la propriété des membranes lipidiques qui se comportent comme un fluide élastique. Les membranes biologiques telles que celle du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi ou même de la membrane plasmique peuvent former des réseaux tubulaires très dynamiques dont les diamètres sont de l'ordre de 50 nm [Lee & Chen 1988] et [Mollenhauer & Morré 1998]. Ces nano-tubes peuvent notamment être formés par des moteurs moléculaires capables de s'attacher d'un côté à la membrane et de l'autre au cytosquelette qu'ils utilisent pour avancer, entraînant de ce fait un tube de membrane avec eux. Ce genre de structure tubulaire peut aussi être formée en laboratoire, à partir de liposomes, de manière très contrôlée par plusieurs techniques telles que l'utilisation d'un flux hydrodynamique [Waugh 1982], de micropipette [Evans *et al.* 1996], de pinces optiques ou encore en utilisant des moteurs moléculaires [Roux *et al.* 2002]. On présente rapidement une de ces techniques qui consiste à maintenir un liposome dans une micropipette afin de contrôler sa tension membranaire et à utiliser une bille piégée dans une pince optique capable de s'attacher à la membrane et

d'en extraire un tube (FIG : 2.13). La bille est recouverte de streptavidine et la membrane du liposome contient un faible pourcentage molaire (en général 0,1%) de lipides biotinylés (FIG : 2.14). Ces deux protéines ont une très forte affinité ($K_d \sim 10^{-14}$) ce qui fait de ce couple de protéines un très bon objet biotechnologique lorsque l'on cherche à créer un lien à l'échelle nanoscopique capable de résister à des forces inférieures au nano-Newton. En rapprochant la bille jusqu'à ce qu'elle se trouve en contact avec la membrane du liposome on permet au lien biotine/streptavidine de s'établir puis en éloignant la bille celle-ci entraîne avec elle la membrane du liposome et forme spontanément un nano-tube.

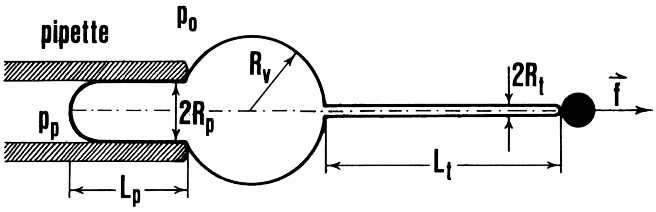


FIGURE 2.13 – Représentation schématique d'un liposome aspiré par une micropipette et tiré par une force f constante de l'autre côté. Tous les paramètres nécessaires à la caractérisation du tube de membrane sont représentés. P_p :Pression à l'intérieur de la pipette. L_p :longueur de la langue. R_p, R_v, R_t :Rayons de la pipette, du liposome et du tube de membrane. L_t :Longueur du tube et f la force nécessaire au maintien de ce tube. D'après [Rawicz *et al.* 2000].

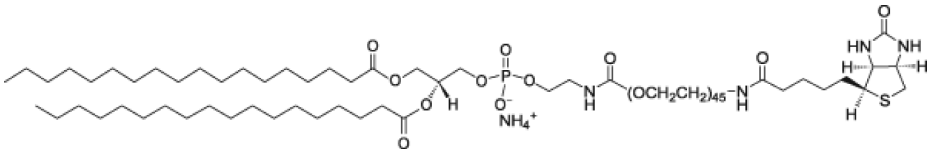


FIGURE 2.14 – Structure du lipide biotynilé PEG-Biot (DSPE-PEG(2000) Biotin 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt)) utilisé dans la composition lipidique des liposomes lors des expériences d'extrusion de tube de membrane à l'aide d'une bille recouverte de streptavidine. D'après http ://avantilipids.com

La géométrie du tube de membrane est à la fois complètement imposée par des paramètres contrôlés par l'expérimentateur et prédite par la théorie [Derényi *et al.* 2002]. En effet, à partir de l'Hamiltonien d'Helfrich on peut écrire l'énergie libre du tube membranaire F_{tube} :

$$F_{tube} = 2\pi R_t L_t [\frac{\kappa}{2(R_t)^2} + \sigma] - f L_t \tag{2.5}$$

Cette équation énergétique reflète la compétition entre l'énergie de surface (terme en σ), qui tend à minimiser la surface du tube et l'énergie de courbure (terme en κ) qui tend à favoriser les grandes courbures en augmentant la surface du tube. Le terme supplémentaire en fL_t correspondant au coût énergétique nécessaire au maintien du tube de longueur L_t par la pince optique. En minimisant cette expression par rapport au rayon du tube et sa longueur on obtient un système d'équations, $\partial F_t/\partial R_t = 0$ et $\partial F_t/\partial L_t = 0$, dont la solution donne le rayon du tube de membrane R_0 et la force nécessaire au maintien du tube f_0 à l'équilibre. On obtient :

$$R_0 = \sqrt{\frac{\kappa}{2\sigma}} \tag{2.6}$$

$$f_0 = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma} \tag{2.7}$$

Grâce au montage décrit précédemment on est capable de mesure la force à l'équilibre f_0 ainsi que de contrôler la tension que l'on applique à la membrane du liposome σ. Il est donc possible de remonter expérimentalement à la valeur de κ en utilisant l'équation 2.7 pour ajuster les données (FIG :2.15).

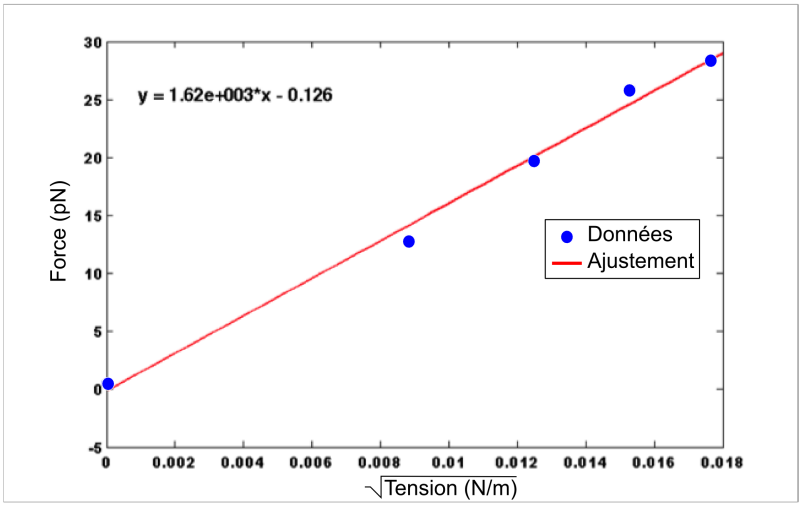


FIGURE 2.15 – Courbe de la force en fonction de $\sqrt{\sigma}$. La tension σ appliquée au liposome est contrôlée par l'aspiration de la micropipette. L'ajustement (en rouge) des données (points bleus) permet de remonter au module de courbure κ de la membrane.

La technique d'extrusion de tube de membrane permet de former un système modèle d'invagination membranaire qui intervient notamment dans les phénomènes d'endocythose. Nous avons utilisé ce type de montage, d'abord au sein de l'équipe de Patricia Bassereau puis en construisant notre propre montage (presenté au chapitre 6) afin de

mimer les déformations que peut subir une membrane plasmique et d'étudier le rôle de l'actine sur ces déformations. Nous avons pu quantifier l'effet de la polymérisation de l'actine sur des tubes de membrane grâce à ce montage qui permet de contrôler et de mesurer tous les paramètres géométriques et mécaniques.

2.3 Conclusion

A travers les deux premiers chapitres j'ai montré l'ensemble des outils biochimiques et biophysiques sur lesquels reposent l'ensemble des expériences que j'ai effectuées durant cette thèse. Le chapitre suivant porte sur la quantification de flux au travers d'une membrane de liposome. L'objectif était d'approfondir la caractérisation de systèmes qui utilisent les liposomes pour reconstruire une fonction cellulaire nécessitant un échange de matériel biochimique entre le milieu extérieur et intéreur. Les chapitres suivants sont plus focalisés sur le changement de forme cellulaire, soit par l'ajout de protéines capables de déformer une membrane, soit par la contraction du cytosquelette d'acto-myosine à la surface d'un liposome.

Chapitre 3

Caractérisation de l'incorporation de l'α-hémolysine à la surface d'un bioréacteur

Sommaire

3.1 Mesure de la perte de contraste 56

3.1.1 Le montage expérimental 58

3.1.2 Mise en place de l'échantillon 60

3.2 Les résultats 60

3.3 Conclusion 66

3.4 Article 1 : α-hemolysin membrane pore density measured on liposomes 68

Le premier volet de mon travail de thèse a consisté à estimer la quantité de pores d'α-hémolysine incorporée dans les membranes de liposomes renfermant un milieu réactionnel (un bioréacteur). Nous avons ainsi pu comparer la densité surfacique de ces pores entre des liposomes préparés par émulsion inverse et par électroformation. Habituellement, lorsque l'on cherche à connaître la quantité de pores présents dans une membrane on utilise une technique de mesure de potentiel trans-membranaire. Cependant, cette technique nécessite d'avoir une faible concentration surfacique de pores, ce qui n'est généralement pas le cas pour les bioréacteurs, et d'insérer une électrode à l'intérieur même du liposome, ce qui va rompre la membrane de ce dernier. On propose ici trois différentes méthodes qui ont l'avantage de ne pas être invasives et dont la haute concentration en pores n'est pas un élément limitant.

Le point de départ de cette étude est la fabrication de systèmes minimalistes à base de liposomes. De tels systèmes permettent, à partir de protéines purifiées, d'étudier la complexité cellulaire. En effet, l'utilisation d'un système simplifié permet de tester et de mieux comprendre les interactions entre les composants du vivant. C'est ce que l'on nomme le "bottom-up", qui permet de pouvoir contrôler tous les paramètres du système artificiel que l'on souhaite créer. D'énormes progrès ont été accomplis dans ce domaine ces dix dernières années [Jewett & Forster 2010]. Par exemple, la biologie

synthétique se focalise actuellement sur la fabrication, de toutes pièces, de systèmes biologiques accomplissant des tâches très précises comme fabriquer des molécules ou de l'énergie, à moindre coût. Une des voies d'étude consiste à synthétiser un système capable de s'auto-répliquer en encapsulant dans une membrane des molécules purifiées et un génome simplifié puis d'ajouter un substrat qui sert de réservoir de "nutriments" au système. On peut citer le projet MCP (Minimal Cell Project), comme un des projets provenant de ces recherches. Le liposome est alors utilisé comme un bioréacteur, capable de fournir un élément en se nourrissant du substrat qui le contient [Noireaux *et al.* 2011],[Noireaux & Libchaber 2004]. Sans avoir à descendre au niveau du génome, il est toutefois possible d'encapsuler directement, dans un liposome, toutes les protéines nécessaires à la reproduction d'une fonction cellulaire. C'est cette méthode qui a été utilisée, au sein de l'équipe de Cécile Sykes, pour reproduire le cortex d'actine [Pontani *et al.* 2009]. Une fois encore, dans cette méthode, le substrat contient les derniers éléments essentiels à l'activation des réactions biochimiques qui reproduisent le cortex d'actine à la membrane.

La majorité des bioréacteurs, à base de liposomes, nécessitent un paramètre de contrôle qui déclenche les réactions chimiques et rend possible l'approvisionnement en nutriments ou énergie du système encapsulé. Un des moyens utilisé consiste à ajouter, dans le substrat, de quoi provoquer l'apparition de pores dans la membrane du liposome permettant ainsi des échanges contrôlés avec la solution extérieure tout en maintenant les molécules d'intérêts encapsulées. La toxine α-hémolysine est un bon candidat, utilisée dans plusieurs systèmes biomimétiques. Il s'agit d'une protéine heptamérique de 33,2 kDa synthétisée par la bactérie *Staphylococcus aureus* dont les monomères sont solubles dans l'eau. Le pore se forme spontanément à la surface d'une bicouche lipidique et permet aux molécules de petites tailles ($\leq$ 3 kDa) de traverser le canal qu'elle forme. La taille étant le seul paramètre de contrôle de l'α-hémolysine, elle permet le passage d'acides aminés, de sucres ou de sels tout en maintenant les plus grosses molécules prisonnières du liposome.

3.1 Mesure de la perte de contraste

Les liposomes, préparés afin de reconstruire un cortex d'actine *in vitro*, contiennent du sucrose à l'extérieur et baignent dans une solution contenant du glucose [Römer *et al.* 2010]. Les sucres sont utilisés pour deux raisons :

- Leur différence de densité permet la sédimentation des liposomes au fond de la chambre d'observation, ce qui facilite leur l'observation.

– La différence d'indice optique entre les deux sucres engendre une différence de phase qui rend les liposomes clairement visibles au microscope à contraste de phase.

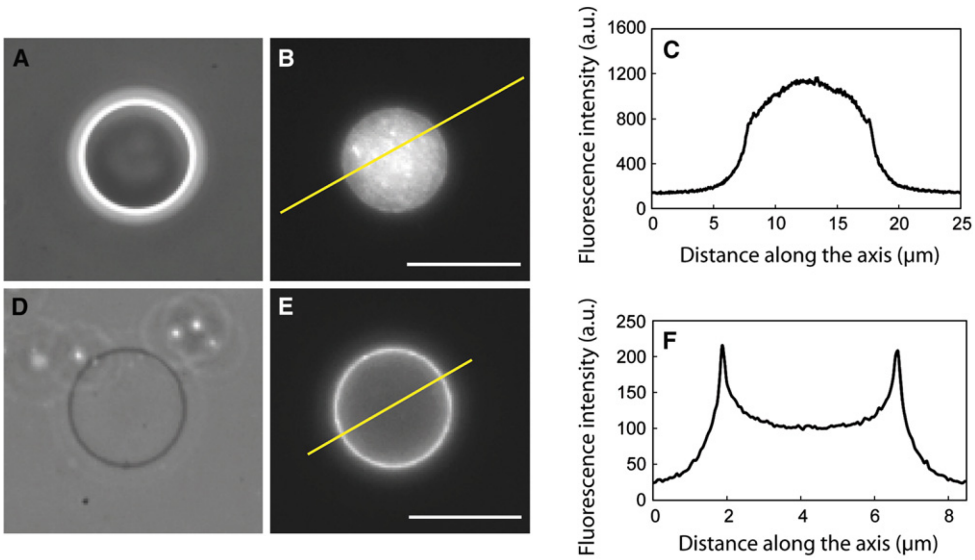


FIGURE 3.1 – Déclenchement de la polymérisation de l'actine à la membrane intérieure d'un liposome par l'ajout d'α-hémolysine. A) et D) Microscopie en contraste de phase. B) et E) Microscopie de fluorescence. Sans pore dans la membrane du liposome, le contraste entre celui-ci et le milieu extérieur est important grâce à l'actine ainsi qu'au sucrose encapsulés. A l'extérieur le glucose présent dans la solution accentue, par différence d'indice, le contraste. B) L'actine fluorescente est répartie de manière homogène au sein du liposome. C) Le profil d'intensité lumineuse le long de la ligne de l'image B. D) En présence de pores, le sucrose encapsulé dans le liposome et le glucose présent dans la solution extérieure diffusent à travers la membrane en plus des sels et de l'ATP. Le contraste de phase disparaît. E) Le cortex d'actine est alors polymérisé à la membrane interne du liposome. F) Le profil d'intensité lumineuse le long de la ligne de l'image E, d'après [Pontani *et al.* 2009].

Nous sommes partis de l'observation, qu'après l'ajout de l'α-hémolysine, certes les sels et l'ATP traversent la membrane et déclenchent la polymérisation de l'actine, mais les sucres diffusent aussi. C'est ce qui explique cette perte de contraste importante, liée à la variation de concentration en sucres entre l'intérieur et l'extérieur du liposome, que nous avons utilisée à notre avantage (FIG :3.1).

Si l'on focalise un faisceau laser à une interface entre deux milieux d'indices différents, la réfraction du faisceau est proportionnelle à la variation d'indice entre ces deux

milieux. C'est ce principe que nous avons utilisé en faisant traverser un faisceau laser à travers la membrane d'un liposome, dont les solutions internes et externes possèdent des indices optiques différents. Le faisceau subit une déflection proportionnelle au changement d'indice lorsqu'il scanne la membrane du liposome. La théorie de Lorenz-Mie, permet de donner le lien entre la pente de la déflection, que nous nommerons $s(t)$ et la variation de l'indice optique Δn, ainsi :

$$s(t) = \gamma \times \Delta n \tag{3.1}$$

Où γ est un paramètre qui prend en compte la configuration géométrique et optique du système.

Le faisceau laser, de faible intensité, permet alors de suivre au cours du temps la diffusion du sucrose et du glucose à travers la membrane. La puissance du laser est suffisamment faible pour ne pas produire de déformation de la membrane et la fréquence de balayage suffisamment importante par rapport au temps de diffusion des sucres pour avoir une mesure de la dynamique menant à l'équilibre.

3.1.1 Le montage expérimental

Le montage expérimental est présenté FIG :3.2. Il s'agit d'une multipince optique utilisant un système de déflecteurs acousto-optiques (AOD), ce qui signifie que les pièges se partagent le faisceau laser à haute fréquence (en temps partagé). Dans notre cas, trois pièges sont utilisés, à une puissance de 5 à 7 mW, afin de piéger trois billes de polystyrène de 3 µm de diamètre (Polysciences, Philadelphia, PA). Un quatrième faisceau, de plus faible puissance ($\leq 0,5$ mW), est ajouté pour aller sonder la membrane du liposome, sans engendrer de déformation. C'est ce faisceau de faible intensité qui permet d'effectuer la mesure de variation de l'indice optique. Le Laser utilisé est à une longueur d'onde de 1064 nm, dans l'infra-rouge (YLP-1064, IPG, Allemagne). Deux premières lentilles L_1 et L_2 permettent d'adapter la taille du faisceau à l'entrée du système d'AOD (AA-Optoelectronics, France). Deux autres lentilles L_3 et L_4 sont placées de manière à ce que le système d'AOD soit le conjugué du plan focal arrière de l'objectif 1 (Pf1). Il s'agit d'un montage dit $4f'$. Grâce à cette géométrie, la modification de l'angle d'entrée du faisceau laser engendre un déplacement dans le plan (latéral et/ou horizontal) de la pince optique sans changer le plan de focalisation. Les lentilles L_6 et L_7 permettent de faire exactement la même chose avec le plan focal arrière de l'objectif 2 (Pf2) et la diode quatre cadrans (QPD). Ainsi on peut enregistrer la déflection du laser lorsqu'il sonde la membrane du liposome (FIG :3.3,B). A ce système est ajouté, une lampe permettant d'illuminer l'échantillon et d'enregistrer des images par l'intermédiaire d'une caméra CCD. Ce montage est directement inspiré d'une méthode développée par [Gögler *et al.* 2007] et [Betz *et al.* 2009].

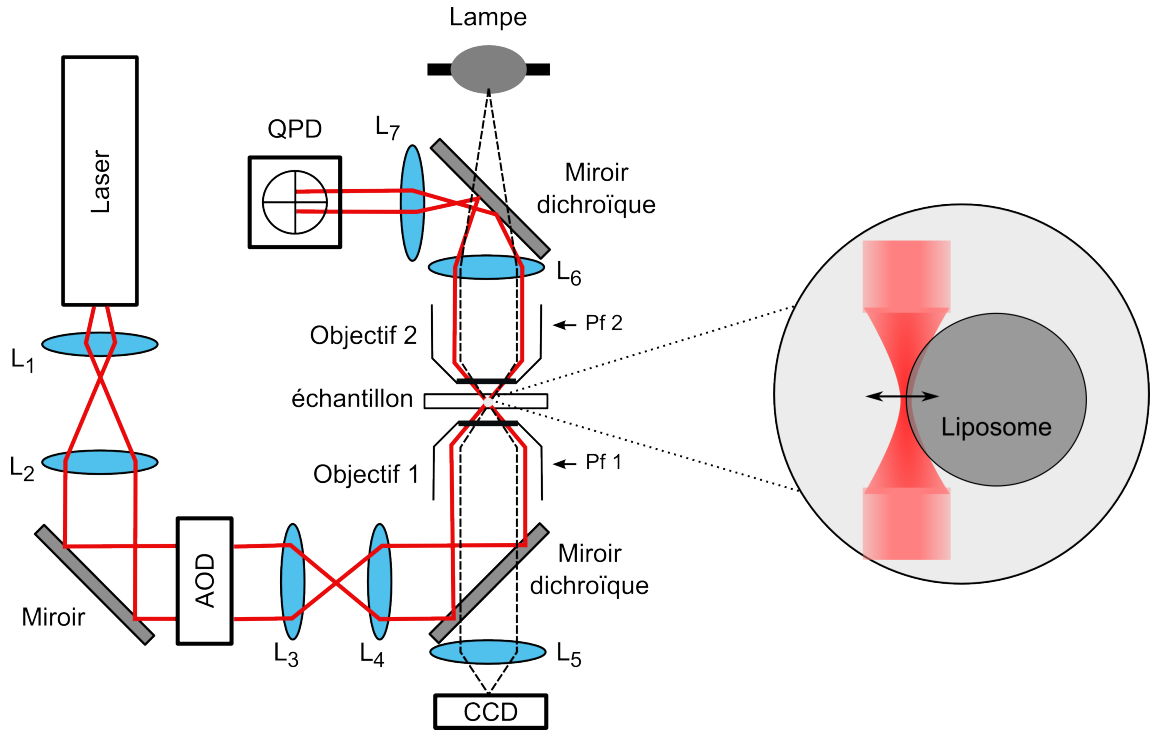


FIGURE 3.2 – Schéma du montage de la multipince optique. Sont représentées en rouge les extrémités du faisceau laser. A gauche, un agrandissement de la zone de l'échantillon montre (flèche aller-retour) le faisceau laser à faible puissance sonder la membrane en passant à travers, les autres pièges tenant les billes ne sont pas dessinés. Le microscope utilisé est un Olympus IX-71 équipé d'un objectif à immersion à eau $\times 60$ d'ouverture numérique NA$= 1,2$. Un changement d'angle par l'AOD engendre un déplacement (x,y) de la pince optique qui engendre à son tour un changement d'angle sur la QPD (n'induisant pas de modification de son signal). Cependant, toute modification d'angle du faisceau laser dans le plan du piège, due à une force, engendrera un déplacement du faisceau sur la QPD. C'est cette modification, sur la QPD, que l'on enregistre et qui est reliée à la force exercée sur le piège optique.

3.1.2 Mise en place de l'échantillon

Les liposomes sont obtenus par électroformation et émulsion inverse d'un même mélange initial de lipides : EPC/DOGS-NTA-Ni/biotin avec des proportions molaires 91 :8 :1. Afin de fixer le liposome durant l'expérience, celui-ci est maintenu par trois billes passivées à la BSA elles-mêmes piégées par trois pinces optiques. Les billes sont incubées durant 20 minutes à 20°C sous agitation dans une solution de BSA à 10 mg/mL, puis rincées dans la solution de travail 30 minutes à température ambiante. De plus la chambre est incubée durant 30 minutes avec une solution de β-caséine à 5mg/mL, puis rincée avec la solution de travail, dans le but de prévenir toute adhésion des liposomes à sa surface. Une fois la chambre remplie de la solution de travail, on injecte les liposomes puis les billes. Il leur faut environ 15 minutes pour sédimenter au fond de la chambre. Afin d'éviter tout phénomène d'évaporation, une couche d'huile est ajoutée pour empêcher les bords de la chambre de se retrouver en contact avec l'air. L'avantage de ce dispositif est de permettre ultérieurement d'injecter, toujours dans la même chambre, la solution contenant l'α-hémolysine. Cette dernière étape est effectuée, très délicatement, une fois qu'un liposome est capturé par la multipince optique (FIG :3.3,A). On dispose alors de quelques minutes pour déclencher la prise de mesure, le temps que la toxine parvienne aux liposomes et forme les pores dans leur membrane.

3.2 Les résultats

Avant l'ajout des pores, la déflection du laser (FIG :3.3,B), enregistrée par la QPD est déterminée par la composition interne et externe du liposome d'indice respectif n_I=1,348 et n_O=1,344. La différence d'indice initiale, Δn=0,04, diminue après l'incorporation des pores dans la membrane puisque les milieux s'échangent, comme on peut le voir sur les mesures prises au cours du temps (FIG :3.4). A faible concentration l'indice optique n est proportionnel à la concentration c, ce qui permet de ne considérer que les concentrations dans la suite des calculs.

$$n(t) = \beta \times c(t) \tag{3.2}$$

De plus, l'α-hémolysine est un pore passif, l'équilibre entre la solution extérieure et celle à l'intérieure du liposome se fait uniquement par diffusion, ce qui nous permet d'écrire :

$$\frac{\mathrm{d}c^i}{\mathrm{d}t} = -\frac{\alpha A_v}{V}\Delta c \tag{3.3}$$

Avec c^i la concentration à l'intérieur du liposome, V son volume, α la perméabilité, A_v la surface du liposome, et $\Delta c = c^i - c^{ext}$ la différence de concentration de part et d'autre de la membrane. La concentration du milieu extérieur c^{ext} est considérée

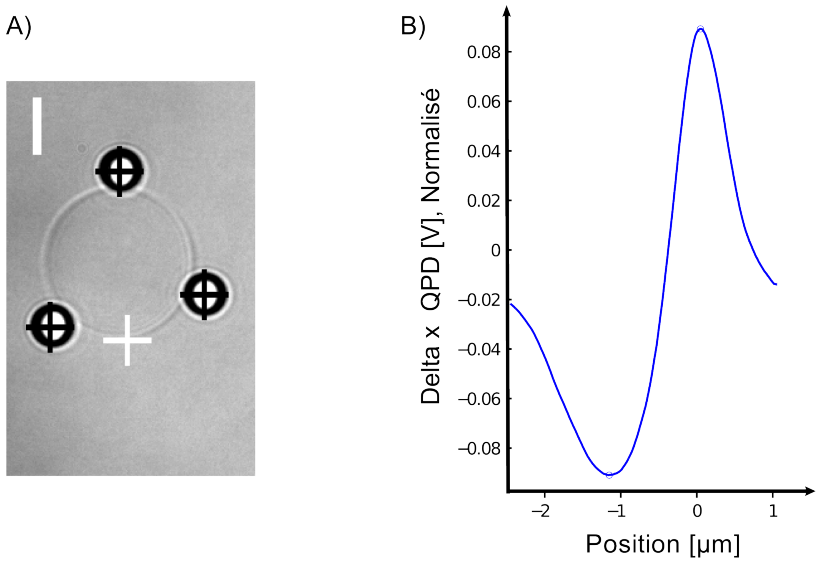


FIGURE 3.3 – A) Image, en fond clair, d'un liposome lors d'une mesure de perte de contraste. Les trois croix noires donnent la position des pinces optiques permettant de maintenir les billes qui entourent le liposome. La croix blanche indique la position du faisceau laser, de faible puissance, servant à sonder la membrane en la traversant. Echelle, 5 µm. B) Déflection du laser, enregistrée par la QPD lorsque le faisceau traverse la membrane du liposome avant d'ajouter l'α-hémolysine.

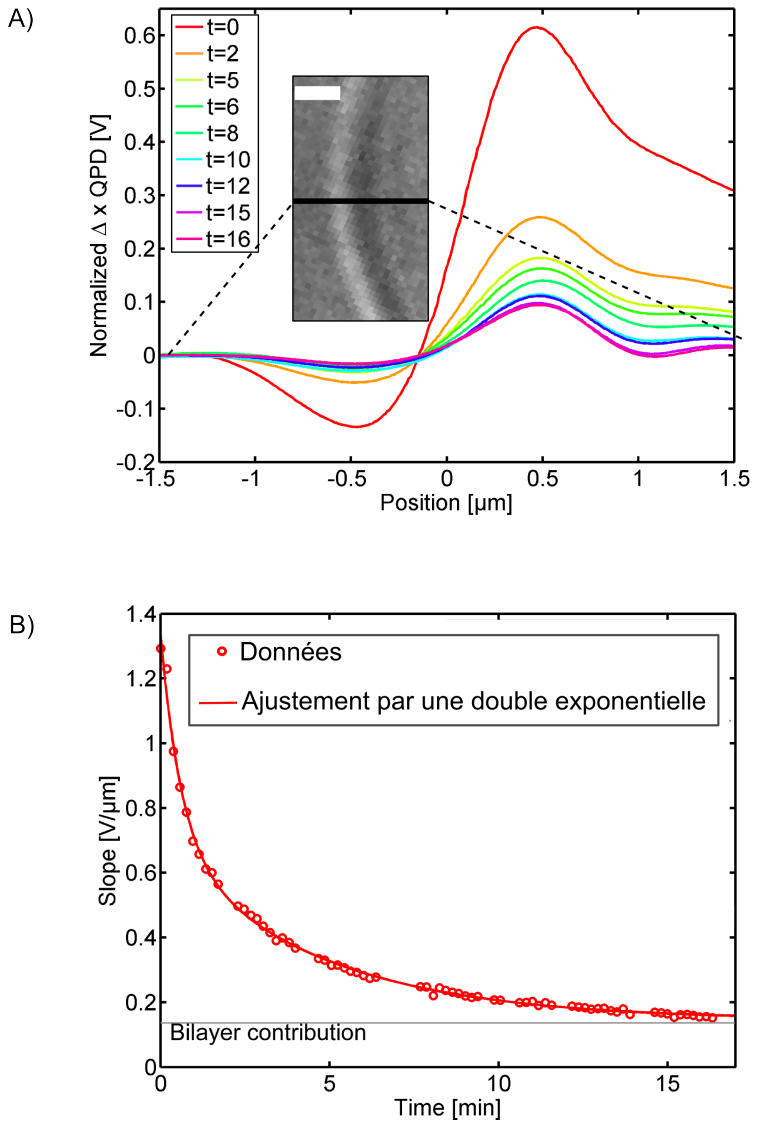


FIGURE 3.4 – A) Décroissance du signal normalisé, enregistré par la QPD, lorsque le faisceau traverse la membrane du liposome, après l'addition de l'α-hémolysine. Les temps (t) entre chaque mesure sont donnés en minutes et mis en évidence sur les courbes par un code couleur. L'encadré représente, par un trait noir, la position du faisceau laser à travers la membrane du liposome lors d'une mesure, l'échelle est de 1 µm. B) Décroissance de la pente au cours du temps, signe d'une diminution de la différence d'indice entre l'intérieur et l'extérieur du liposome. La courbe rouge représente l'ajustement des données (ronds rouges) par une double exponentielle, chacune d'elle provenant de la diffusion du sucrose et du glucose à travers la membrane. On remarquera que la courbe décroît asymptotiquement vers une constante qui correspond à la contribution de la membrane du liposome, à la déflection du faisceau.

comme constante au cours du temps, ce qui permet de faire intervenir la différence de concentration à la place de c^i dans l'équation. On obtient alors :

$$\frac{\mathrm{d}(\Delta c)}{\mathrm{d}t} = -\frac{3\alpha}{R}\Delta c, \tag{3.4}$$

dont la solution est de la forme :

$$\Delta c(t) = \Delta c_0 \exp\Big(-\frac{3\alpha}{R} \times t\Big) \tag{3.5}$$

Avec Δc_0 la différence de concentration initiale. Cette solution est valable pour chacun des sucres, leur contribution ne faisant que s'additionner. Ainsi en combinant l'équation 3.3 et l'équation 3.5, pour chaque molécule nous obtenons :

$$s(t) = s_s \exp\Big(-\frac{3\alpha_s}{R} \times t\Big) + s_g \exp\Big(-\frac{3\alpha_g}{R} \times t\Big) + s_M \tag{3.6}$$

s_s et s_g sont de simples préfacteurs, $s_{s,g} = \gamma\beta\Delta c_0^{s,g}$ qui permettent de prendre en compte la linéarité entre la pente mesurée, l'indice optique et la concentration ; et de remonter à la perméabilité des deux sucres $\alpha_{s,g}$. Le terme constant s_M représente la contribution constante de la membrane.

L'ajustement des données nous a donc permis dans un premier temps de remonter aux valeurs de perméabilité pour chacun des sucres : $\alpha_g = 1.1 \pm 0.1 \times 10^{-7}$m/s et $\alpha_s = 1.5 \pm 0.2 \times 10^{-8}$m/s. Ensuite nous avons testé la dépendance d'une de ces valeurs, la perméabilité du sucrose, en fonction de la taille des liposomes et de la manière dont ils ont été formés, par électroformation ou par émulsion inverse (FIG :3.5). Aucune différence significative n'apparaît, que ce soit en fonction du rayon des liposomes ou de la méthode de formation utilisée.

Nous avons repris un modèle, déjà établi par Pappenheimer et Renkin de diffusion d'une molécule à travers un pore passif, que nous avons adapté au sucrose et à l'α-hémolysine afin de quantifier le nombres de pores présents à la surface des liposomes [Pappenheimer *et al.* 1951], [Renkin 1954]. La concentration d'α-hémolysine injectée étant suffisante pour saturer la membrane des liposomes dans chaque cas. Soit N le nombre de molécules de sucrose passant à traver le pore, on peut alors écrire :

$$\frac{\mathrm{d}N}{\mathrm{d}t} = -\frac{DA_p}{l}\Delta c.N_{tot} \tag{3.7}$$

La variation du nombre de molécules de sucrose au sein du liposome dépend de la différence de concentration en sucrose Δc, de son coefficient de diffusion D, de la longueur du pore l ainsi que de sa surface apparente par rapport au sucrose A_p et du nombre total de pores présents à la membrane N_{tot}. En reprenant l'équation 3.3, et en l'exprimant en fonction du nombre de molécules au lieu de la concentration on obtient :

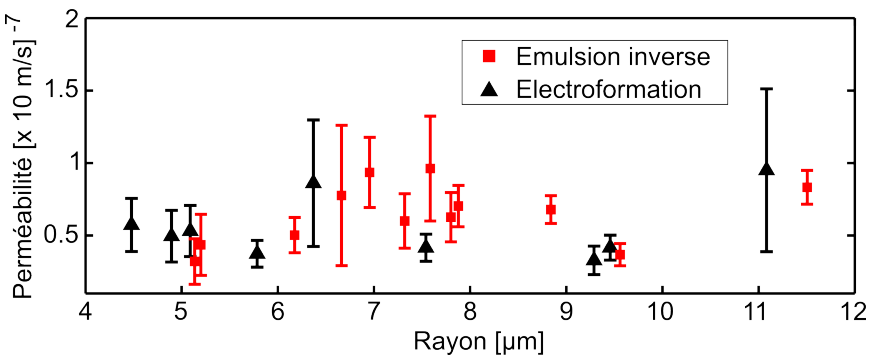


FIGURE 3.5 – Mesures de la perméabilité du sucrose en fonction du rayon des liposomes et de la manière dont ils ont été préparés. Electroformation en noir et Emulsion inverse en rouge.

$$\frac{\mathrm{d}N}{\mathrm{d}t} = -\alpha A_v \Delta c \tag{3.8}$$

Nous avons utilisé la relation de Stokes-Einstein pour exprimer le coefficient de diffusion du sucrose D en fonction de son rayon hydrodynamique a, $D = k_B T/(6\pi\eta a)$. Puis, en égalisant l'équation 3.7 et 3.8 on obtient une expression pour la densité de pores ρ au sein d'un liposome pour laquelle tous les paramètres géométriques sont donnés dans la littérature [Schultz & Solomon 1961], [Song *et al.* 1996], [Menestria 1986], [Ma & Cockroft 2010]. Le seul élément manquant correspond à la perméabilité α, qui est donnée par les mesures effectuées précédemment.

$$\Longrightarrow \rho = \frac{N_{tot}}{A_v} = \frac{\alpha l}{A_p} \times \frac{6\pi\eta a}{k_B T} \tag{3.9}$$

Nous avons donc pu quantifier la densité de pores d'α-hémolysine présente à la surface d'un liposome en fonction de la méthode de préparation de ces derniers. Aucune différence significative n'apparaît sur la quantité de toxines incorporées à la membrane d'un liposome électroformé par rapport à un liposome formé par la méthode de l'émulsion inverse. Cependant, le changement de la composition lipidique des membranes semble modifier la densité surfacique de pores, dans le cas étudié la variation entre les types de membranes est tout de même d'un facteur 5 environ (voir TABLE :3.1).

Par aspiration d'un liposome et extrusion de tube

La méthode optique utilisée a aussi été validée, en collaboration avec Karine Guevorkian et Clément Campillo, en la confrontant à deux autres méthodes faisant intervenir l'aspiration d'un liposome et l'extrusion d'un tube de membrane à partir d'un liposome. Ces deux méthodes sont basées sur la variation de volume du liposome, une fois

TABLE 3.1 – Tableau récapitulant les valeurs obtenues pour la densité surfacique de pores ρ, la distance moyenne entre eux $\overline{d}$ et le nombre d'expériences N pour les trois méthodes de mesures : perte de contraste, aspiration par une micropipette et extrusion de tube. Deux types de composition de membrane ont été utilisées EPC/NTA et EPC. Pour les expériences avec des membranes EPC les incertitudes données proviennent de l'ajustement des données avec un intervalle de confiance de 95%.

Méthode	Lipides	$\rho(\mu m^{-2})$	$\overline{d}(nm)$	N
Perte de contraste (EF)	EPC/NTA	125 ± 45	90 ± 16	9
	EPC	34 ± 5	171 ± 12	1
Perte de contraste (EI)	EPC/NTA	147 ± 45	82 ± 12	12
	EPC	24 ± 5	208 ± 22	1
Aspir. Micropipette	EPC/NTA	122 ± 69	90 ± 30	4
Extrus. de tube	EPC/NTA	146 ± 67	83 ± 30	4

l'équilibre de la diffusion entre le sucrose et le glucose atteint (environ 15 minutes). Contrairement à la mesure de la perte de contraste, ces deux méthodes de mesure sont assez intrusives puisqu'elles nécessitent de déformer l'objet d'étude.

L'aspiration d'un liposome par une micropipette permet de contrôler la différence de pression que l'on applique. Cette différence engendre alors un flux d'eau à travers les pores, faisant varier le volume du liposome auquel nous avons facilement accès par des mesures géométriques du rayon de la micropipette r_p, de la longueur de la langue $L(t)$ et du rayon du liposome $R(t)$:

$$V(t) = \frac{2\pi r_p^3}{3} + \pi r_p^2(L(t) - r_p) + \frac{\pi R(t)^3}{3}(2 + 3u(t) - u(t)^3) \tag{3.10}$$

Avec,

$$u(t) = \sqrt{1 - \left(\frac{r_p}{R(t)}\right)^2} \tag{3.11}$$

On suppose ensuite que la variation de volume est uniquement due au flux à travers les pores. Dans ce cas nous négligeons la perméabilité de la membrane sans pore. Le modèle utilisé est celui mis au point par Sampson en 1891 du flux J, d'un fluide visqueux η_i, à travers N_{tot} ouvertures circulaires de rayon r [Sampson 1891] :

$$J = N_{tot} r^3 \frac{\Delta P}{3\eta_i} \quad \text{avec,} \quad J = \frac{\mathrm{d}V}{dt} \tag{3.12}$$

L'ajustement des courbes de pertes de volumes en fonction du temps nous permet donc de remonter à la quantité N_{tot} de pores présents à la surface du liposome. Les résultats

étant du même ordre de grandeur que ce qui est trouvé par la mesure de perte de contraste (voir TABLE :3.1).

L'extrusion de tube de membrane par un flux dont on fixe la vitesse permet elle aussi de connaître la quantité de pores adsorbés à la membrane d'un liposome. Un liposome adhère à la pointe d'une micro-tige. Le déplacement du milieu extérieur engendre une force sur le liposome, si celle-ci est suffisamment forte elle induit la formation d'un tube de membrane reliant la pointe de la micro-tige au liposome. Comme nous l'avons déjà mentionné la force nécessaire à l'extrusion d'un tube de membrane s'exprime de la manière suivante :

$$f_{\text{tube}} = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma} = 2\pi\kappa/r_t \text{ , avec } r_t \text{ le rayon du tube} \tag{3.13}$$

Lorsque le milieu extérieur est mis en mouvement, à une vitesse U, le tube croît à une vitesse constante $\dot{L}$. A chaque instant la force de maintien du tube compense la force de viscosité. De plus, le liposome étant perméable sa tension reste la même à tout instant, soit :

$$f_{\text{friction}} = f_{\text{tube}} \implies 6\pi\eta R(U - \dot{L}) = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma} \tag{3.14}$$

En utilisant la conservation du volume et l'expression du flux de l'équation :3.12, on obtient le nombre de pores en fonction de la vitesse d'élongation du tube de membrane :

$$N_{tot} = \frac{\pi\kappa^2\eta_i}{9\eta^3 R r^3}\frac{\dot{L}}{(U - \dot{L})^3} \tag{3.15}$$

Les valeurs obtenues sont aussi en accord avec les mesures effectuées par les deux autres méthodes (voir TABLE :3.1).

3.3 Conclusion

Dans cette étude on a exposé trois expériences différentes permettant toutes de quantifier la densité surfacique d'α-hémolysine à la membrane de liposome. La méthode optique, sur laquelle j'ai consacré mon temps, à l'avantage de ne pas être invasive. De plus, elle permet de suivre dynamiquement les échanges entre le milieu extérieur et intérieur du liposome. Nous avons aussi pu montrer que la densité surfacique d'α-hémolysine dépend du type de lipides utilisés pour former la membrane, et non pas de la méthode de préparation des liposomes.

Par ces trois méthodes complètement différentes, nous permettons la caractérisation des systèmes de types bioréacteurs qui utilisent l'α-hémolysine comme pores. On peut toutefois élargir les applications du système de multipince optique, qui est capable de suivre la dynamique des flux transmembranaires, à tout autre pore passif sans avoir à

changer le protocole ou les modèles. Par ailleurs, l'utilisation de pores actifs n'empêcherait en rien la prise de mesures, cependant il faudrait modifier les modèles utilisés, puisque dans notre cas ils sont basés sur de la diffusion et non sur de la convection de particules (telles que les sucres) ou de solvant (l'eau).

3.4 Article 1 : α-hemolysin membrane pore density measured on liposomes

Joël Lemière, Karine Guevorkian, Clément Campillo, Cécile Sykes et Timo Betz

Soft Matter (2013)
9 : 3181-3187

Soft Matter

RSC Publishing

PAPER

View Article Online
View Journal

α-Hemolysin membrane pore density measured on liposomes

Cite this: DOI: 10.1039/c3sm27812c

Joël Lemière,[abcd] Karine Guevorkian,[abc] Clément Campillo,[abc] Cécile Sykes[abc] and Timo Betz*[abc]

Received 16th July 2012
Accepted 9th January 2013

DOI: 10.1039/c3sm27812c

www.rsc.org/softmatter

Membrane pore proteins are powerful tools that allow manipulation of the inside composition of micron sized bioreactors such as artificial liposomes. While the pores self-assemble very reliably on phospholipid bilayers, the determination of the number of pores *in situ* for liposomes remains difficult. Here we present three independent methods to establish the number of pores on different types of liposomes: (A) the loss of refractive index due to equilibration of the inside and outside buffer conditions, and the loss of volume by (B) membrane aspiration and by (C) membrane tether pulling experiments. With these three methods we are able to determine the pore density on the membrane, and all measurements give similar values; an average pore distance is found on the order of 100 nm.

Downloaded by PhysicoChimie Curie (UMR CNRS 168) on 12 February 2013
Published on 07 February 2013 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C3SM27812C

1 Introduction

During the past decades, artificial phospholipid bilayer liposomes have been extensively studied. One major research theme was the possibility of using these liposomes as microscopic reactors for biomimetic systems.[1,2] The advantage of artificial liposomes is the possibility of controlling both the lipid bilayer composition and the inside content. This allows reconstitution of certain aspects of living biological systems, and even rebuilding of certain properties of living cells. Recent advances have shown that it is possible to control the liposome inside solution up to a degree where protein construction *via* ribosomes is possible,[2] or to even reconstitute the actin cortex of living cells by inducing actin polymerization at the inner membrane.[1] Two important liposome preparation techniques are electroformation and the recently developed inverted emulsion technique. While the electroformation is, today, a simple and common technique, the inverted emulsion method is more complex but allows encapsulation of a well defined and precious content within the liposomes while having a totally different solution outside. In this report we will investigate both formation methods.

Many applications of liposome micro-reactors require a controlled triggering of the inside reactions and a steady control of parameters such as salt concentration, pH or the supply of energy in the form of adenosine triphosphate (ATP). This problem was solved by the addition of membrane pores with a well defined pore diameter, thus allowing the exchange of molecules below a mass threshold, while preserving larger molecules such as proteins inside the liposome. A common pore protein used for that is the bacterial toxin α-hemolysin, which is secreted by the bacteria *Staphylococcus aureus* as a water soluble monomer with a size of 33.2 kDa.[3–5] Monomers self-assemble spontaneously on a phospholipid bilayer to form a mushroom-shaped pore with a cutoff mass of about 2 kDa, which is permeable to ions and single nucleotides, but blocks larger proteins that do not fit through the 1.5 nm pore diameter.[3] The α-hemolysin pore therefore satisfies the mentioned requirement to control pH, ions and ATP-concentration, while confining proteins inside the liposomes. Furthermore, the pore properties can be well controlled by genetic modifications.[6] However, the quantification of the pore insertion density has remained a complex problem, which was commonly ignored as the pore protein was added in high concentrations to simply result in a saturation of pores on the membrane. Nevertheless, a good estimation of the pore concentration is important to understand the dynamics of the molecular exchange and to estimate the material fluxes of molecules consumed inside the liposome, such as ATP or amino acids.[2] Commonly, the presence of pores is measured by the ion current flow, when applying a membrane potential. However, this method only works well for a small number of pores that are generally situated on a small membrane patch that is aspirated into a micropipet.[6] On liposomes, this technique is not possible as it requires the insertion of an electrode into the liposome, which ruptures the membrane and thus destroys the liposome.

Here we address the question of pore density by presenting three different methods, which give consistent results. Interestingly, we find that the equilibration of different inside–outside conditions might take several minutes during which the system is out-of-equilibrium.

[a]Institut Curie, Centre de Recherche, F-75248, Paris, France. E-mail: timo.betz@curie.fr
[b]CNRS, UMR168, F-75248, Paris, France
[c]UPMC Univ Paris 06, UMR 168, F-75005, Paris, France
[d]Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75205, Paris, France

Downloaded by PhysicoChimie Curie (UMR CNRS 168) on 12 February 2013
Published on 07 February 2013 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C3SM27812C

2 Methods

2.1 Liposome preparation

Liposome composition. EPC, DOGS-NTA-Ni, and DSPE-PEG(2000)-biotin (all purchased from Avanti Polar Lipids) are mixed with a molar ratio of EPC/DOGS-NTA-Ni/biotin of 91 : 8 : 1 (EPC/NTA).

Buffer composition. To image liposomes in phase contrast microscopy, different inside and outside buffers are used.

The inside buffer (I-Buffer-1) consists of 6.5 μM G-actin (including 20% fluorescently labeled actin), 10 mM HEPES (pH 7.6), 0.1 mM $CaCl_2$, 100 mg ml^{-1} dextran, 0.2 mM ATP, 6 mM dithiothreitol (DTT), 0.13 mM diazabicyclo[2,2,2]octane (Dabco), and 280 mM sucrose. The outside buffer (O-Buffer-1) contains 10 mM HEPES (pH 7.5), 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $CaCl_2$, 2 mM ATP, 6 mM DTT, 0.13 mM Dabco, 275 mM glucose, and 0.5 mg ml^{-1} casein. These buffers were used in liposome aspiration and tube pulling experiments. The inside buffer (I-Buffer-2) consists of 300 mM sucrose. The outside buffer (O-Buffer-2) contains 300 mM glucose and 0.5 mg ml^{-1} casein. Contrast loss measurements are applied on liposomes prepared with these buffers.

Inverted emulsion.[1] Lipids are dissolved in mineral oil (Sigma) at a total concentration of 0.5 mg ml^{-1}. A volume of 5 ml of this oil–lipid mixture is sonicated in a bath at 35 degrees for 30 min at a power of 30 W, cooled to room temperature and then stored at 4 degrees for up to a week. An emulsion between the inside buffer and the oil–lipid mixture is prepared and added on top of the outside buffer. Subsequent centrifugation transports the inside solution emulsion across a lipid monolayer as described earlier[1] and liposomes are collected.

Electroformation.[7] Briefly, the lipid mix is dissolved in chloroform (2.5 mg ml^{-1}) and 10 μl of this solution is applied on an ITO glass slide. The slides are stored in vacuum for 1 h to evaporate the solvent. Subsequently, two slides are assembled into a chamber of width 1 cm and height 2 mm. The cavity is filled with the inside buffer. An alternating electric field (10 Hz, 2.3 V) is applied across the chamber for 8 hours. Liposomes created this way are diluted in the external buffer and stored at 4 degrees for up to a week.

α-Hemolysin. The pore-forming protein α-hemolysin (Sigma) is dissolved to a final concentration of 1 mg ml^{-1} in a buffer containing 150 mM KCl and 10 mM HEPES. To achieve comparable results, we always used the same final concentration of 0.1 mg ml^{-1} α-hemolysin in the three different experiments described here.

2.2 Contrast measurement for the refractive index difference

To determine the relative difference of the refractive index between inside and outside a liposome, we use a recently developed method[8,9] based on light refraction across the membrane. A laser focus positioned at the interface of a liposome filled with a higher refractive index buffer refracts the light as a function of the refractive index differences. We record this asymmetry in the far field of the laser using a quadrant photodiode (QPD) (see Fig. 1A) mounted on an Olympus IX-71 microscope stand equipped with a ×60 water immersion objective (NA 1.2). During the experiments the liposome is fixed with three beads in a multiple optical tweezer system. Each bead is trapped by an effective power of ≃5 to 7 mW. Meanwhile, we scan the focus of a weak (power ≤ 0.5 mW) IR laser of wavelength 1064 nm over the membrane and measure the diffracted light using a QPD in the back-focal plane of the condenser. This scan results in a curve as shown in Fig. 2A that is similar to the one predicted and measured on scans over

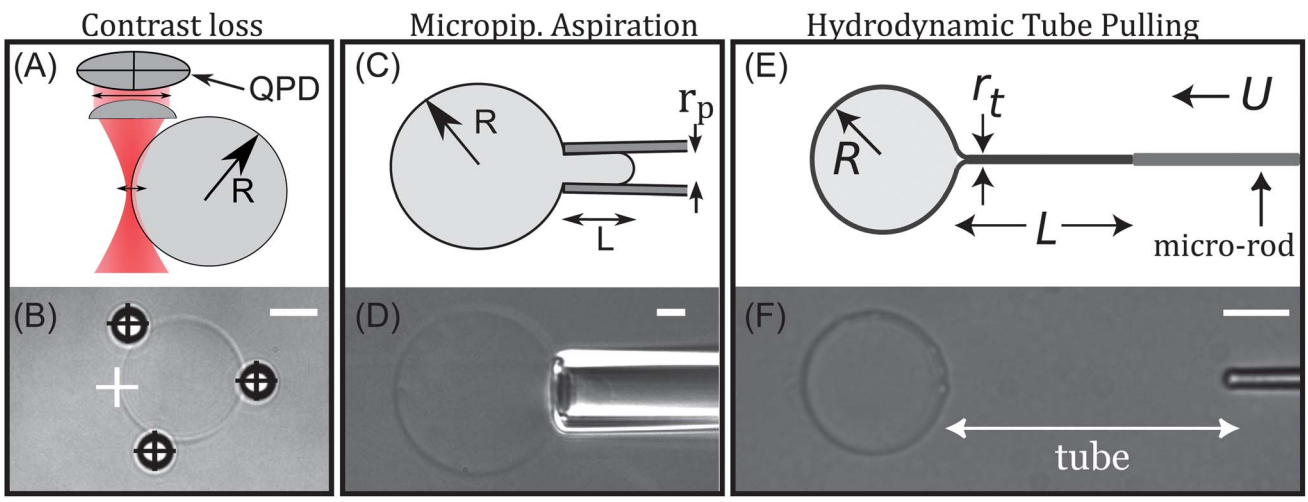


Fig. 1 Representation of the three different measurement methods. The contrast loss method (A and B) exploits the refraction of light at the membrane, which can be measured using a quadrant photodiode (QPD). (B) A typical liposome before pore addition. The probe laser is positioned at the white cross. The liposome is maintained by three beads trapped by multiple optical tweezers (black crosses). (C and D) Micropipet aspiration directly measures the loss of volume and can be used to measure the membrane permeability. (E and F) Tube extrusion from liposomes using hydrodynamic tube extrusion (HTE) technique. (E) Schematic of tube formation inside a microfluidic channel using HTE. A liposome with radius *R* is adhered to a micro-rod and subjected to a flow *U*. The length of the tube, *L*, is measured as a function of time. r_t is the radius of the tube. (F) Snapshot of a tube formed from a liposome using HTE. Scale bars are 5 μm.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Downloaded by PhysicoChimie Curie (UMR CNRS 168) on 12 February 2013
Published on 07 February 2013 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C3SM27812C

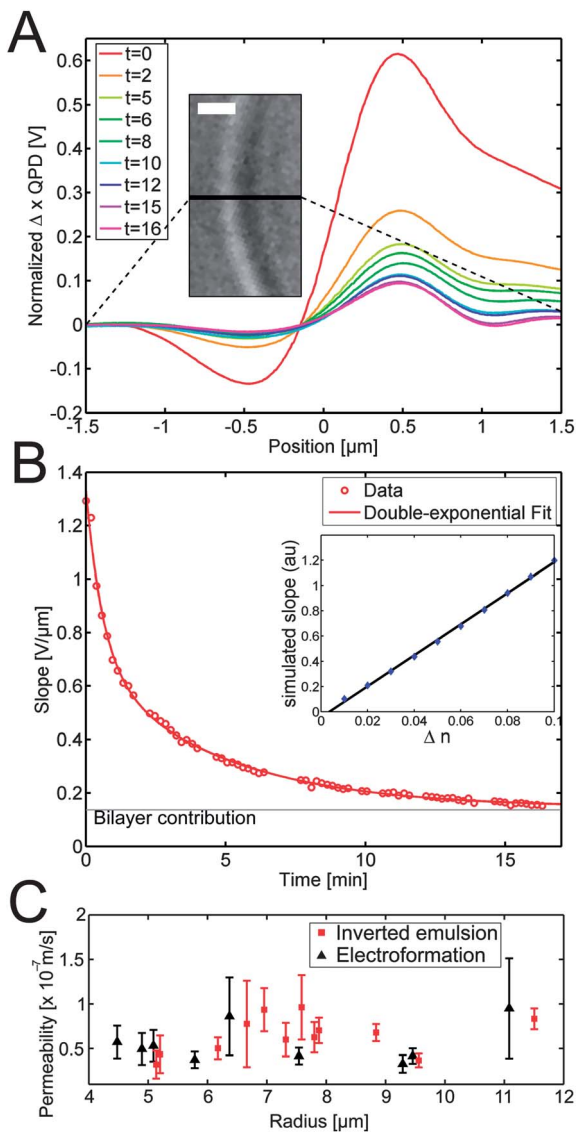


Fig. 2 (A) Decrease of signal recorded at the QPD after addition of membrane channels α-hemolysin, time (t) is given in minutes. The signal represents the scan in the x direction (black line in the inset) of the diffracted light normalized by the sum signal of the QPD. The position is relative to the membrane. The inset represents an image of the membrane with the position of the laser during the scan (black line), scale bar is 1 μm. (B) The decay of the slope quantifies the loss of refractive index differences, and a double exponential decay function (red line) monitors the equilibration of the different molecules. Inset: numerical simulations establish the linear relation between the slope of the scan curve and the refractive index difference. Data points are simulations, and the line is a linear fit. (C) Sucrose permeability as a function of liposome radius prepared by electroformation (black triangle) or inverted emulsion (red square).

polystyrene beads.[10] According to the Lorenz–Mie theory the slope of the scan curve depends linearly on the refractive index difference. The numerical solution of the Lorenz–Mie theory[11] confirms the linear dependence of the slope s on the refractive index difference Δn as $s(t) = \gamma \times \Delta n$, where γ is a complex function of the geometry and the optical configuration (inset Fig. 1B). To analyse the data, the linear dependence of the slope on the refractive index difference is used. We measure the change in refractive index difference by recording the slope of the curve along the edge of the liposomes, while the concentration of glucose and sucrose equilibrates.

2.3 Liposome aspiration

Liposomes are aspirated as shown in Fig. 1C and D. Pipets are pulled from glass capillaries using a micropipet puller (P2000, Sutter Instruments, USA). The opening of the pipet is cleaved to a diameter of 3–5 μm by a microforge (MF-830, Narishige, Japan). Micropipets are filled with glucose buffer and mounted on the experimental chamber. Micropipets and experimental chambers are passivated by applying a 5 mg ml^{-1} casein solution for 30 minutes. Micropipette aspiration experiments are performed on a Nikon TE2000 inverted microscope with a ×100/NA 1.3 oil immersion objective (Nikon). To vary the pressure inside the micropipet, it is connected to a water reservoir of variable height using a tube system. Before each experiment, the point of zero pressure between the micropipet and the chamber is measured by adjusting it to the point of zero flow by aspirating tracer particles that are observed in the micropipet.

2.4 Hydrodynamic tube pulling

The experimental chamber consists of a single microfluidic channel made out of poly(dimethylsiloxane) (PDMS), which is attached to a cover-glass through plasma activation. One side of the channel is cut open to allow the introduction of the liposomes and the glass micro-rod. The other end is connected to a syringe pump (KDS Scientific, USA), which operates in aspiration mode. The details of the setup are explained elsewhere.[12] The channel is 200 μm high, 600 μm wide and 2 cm long. A coated glass micro-rod is used to attach the liposomes and to pull a tether under medium flow. Thin-tip micro-rods are prepared by pulling borosilicate rods (1 mm outer diameter) using a laser-based puller (P-2000, Sutter Inst., USA). The rods are then forged to 2–3 μm using a micro-forge (Narishige, Japan). Rods are coated with streptavidin to attach the membrane to the glass. This is done by first cleaning them in plasma cleaner for 30 seconds, then incubating them in 0.1% v/w poly-lysine (Sigma) for 30 minutes. Then they are rinsed with PBS and incubated in 2.5 mg ml^{-1} streptavidin (Sigma) in PBS solution for 1 hour. The adhesion of the liposomes to the glass micro-rod takes place through the streptavidin on the micro-rod and the biotinylated lipids in the liposome membrane. Once the liposome is attached to the rod, it is brought into the channel using a mechanical micro-manipulator and raised to the middle of the channel, see Fig. 1E and F. Using the syringe pump in aspiration mode a fixed debit, D_f, is applied. The flow velocity has a Poiseuille distribution, is strongest at the mid-height of the channel, and is related to D_f as: $U = 1.5 \times D_f/A_c$, where A_c is the cross-section of the channel. The tubes are extruded after equilibration of the sucrose–glucose gradient through the α-hemolysin pores. Liposomes are visualized in epifluorescence using an inverted microscope (Zeiss Axiovert 100) equipped with a ×20 air objective (NA 0.45). Time lapse movies are recorded with a CDD camera (Luca-R, Andor) at 200 ms intervals. Traction of the liposomes is performed using ImageJ software (NIH).

Downloaded by PhysicoChimie Curie (UMR CNRS 168) on 12 February 2013
Published on 07 February 2013 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C3SM27812C

3 Results and discussion

3.1 Time dependent refractive index difference

Before the incorporation of pores into the lipid bilayer, liposomes are visible in bright-field microscopy due to the difference in the refractive indices of sucrose and glucose. The addition of pores allows equilibration of the glucose–sucrose concentrations across the membrane. This in turn reduces the asymmetry measured by the QPD. To quantify the loss of contrast we use the linear region of the scan curve as shown in Fig. 2A.[11] The slope of the linear regime between the minimal and the maximal signal is found by fitting a line along the 200 nm region centered around the midpoint between the curve minimum and maximum.

Before pore addition, the deflection is determined by the refractive indices of the inside buffer and outside buffer, $n_I = 1.348$ and $n_O = 1.344$, respectively. The initial refractive index difference of $\Delta n = 0.004$ decreases while the concentration equilibrates across the membrane through the α-hemolysin pores. To measure the permeability, which allows estimation of the pore density, we will only require the time dependence of Δn that is proportional to the slope s (see Material and methods).

Fig. 2B shows the decrease of the slopes over time, starting right after the addition of pores. The equilibration of the glucose–sucrose decreases the slope s until the point where only the refraction of the lipid bilayer is left. The contribution of the pure membrane is detectable (0.15 V μm^{-1}) and constant as shown in Fig. 2A and B.

In the following, we will use the fact that for small concentrations, the refractive index is a linear function of the concentration of molecules in solution; hence n is proportional to c and we need to consider only the concentration change over time to model the data. Here we can make use of the known behaviour of concentration equilibration due to the permeability α, which contributes to the permeability equation:

$$\frac{dc^i}{dt} = -\frac{\alpha A}{V}\Delta c \tag{1}$$

where c^i is the concentration inside the liposome, α is its permeability, A is the liposome surface, and $\Delta c = c^i - c^{ext}$ the concentration difference across the membrane. Furthermore, since we know that the outside concentration stays constant due to the large volume, $dc^i/dt = d(\Delta c)/dt$ and thus, knowing the radius R of the liposome:

$$\frac{d(\Delta c)}{dt} = -\frac{3\alpha}{R}\Delta c, \tag{2}$$

gives the solution:

$$\Delta c(t) = \Delta c_0 \exp\left(-\frac{3\alpha}{R} \times t\right) \tag{3}$$

where Δc_0 is the initial concentration difference. In fact, this calculation needs to be done for both molecular species, sucrose and glucose, marked respectively with the indices s and g:

$$\Delta c^{s,g}(t) = \Delta c_0^{s,g} \exp\left(-\frac{3\alpha_{s,g}}{R} \times t\right) \tag{4}$$

The refractive index difference can be written as:

$$\Delta n = (n_i - n_{ext}) + \Delta n_M \tag{5}$$

with n_i and n_{ext} as the inside and outside refractive indices respectively and Δn_M the membrane contribution, we can rewrite the expression using β as an unknown proportionality constant between concentration and refractive index to yield:

$$\Delta n(t) = (n_i^s(t) + n_i^g(t)) - (n_{ext}^s + n_{ext}^g) + \Delta n_M \tag{6}$$

$$\Delta n(t) = \Delta n^s(t) + \Delta n^g(t) + \Delta n_M \tag{7}$$

$$\Delta n(t) = \beta\Delta c^s(t) + \beta\Delta c^g(t) + \Delta n_M \tag{8}$$

Here we have established the connection between the total refractive index difference and the different contributions from glucose, sucrose and the membrane. As previously mentioned, the measured slope of the scan is directly proportional to the refractive index difference. Thus:

$$s(t) = s_s \exp\left(-\frac{3\alpha_s}{R} \times t\right) + s_g \exp\left(-\frac{3\alpha_g}{R} \times t\right) + s_M \tag{9}$$

where s_s and s_g are simple prefactors $s_{s,g} = \gamma\beta\Delta c_0^{s,g}$ that ensure the transition from concentration difference to slope. For the following we are exclusively interested in the time dependence of eqn (9), which yields the permeabilities $\alpha_{s,g}$. The last term accounts for the contribution of the lipid bilayer that is unaffected by the change of molecules. Fig. 2B shows the slope contribution of the pure membrane $s_M = 0.1453 \pm 0.01\,V\,nm^{-1}$.

As seen in Fig. 2B, experimentally we find a slow and a fast exponential decay. We can attribute the fast decay to the equilibration of the smaller molecule, glucose, $\alpha_g = 1.1 \pm 0.1 \times 10^{-7}$ m s^{-1} and slow decay to sucrose, $\alpha_s = 1.5 \pm 0.2 \times 10^{-8}$ m s^{-1}. Commonly, the fast decay is less accurate; hence we exclusively use the slow equilibration of sucrose for the analysis presented in this work, which is represented by the first term of eqn (9). Note that this difference in the speeds of glucose and sucrose molecules leads to an intermediate timescale where the effective tension will increase as more glucose has entered the liposome than sucrose has left.

We perform multiple experiments with this technique using both vesicles made by electroformation (EF) or inverted emulsion (IE). Fig. 2C shows the dependence of the permeability coefficient α_s with the radius of liposomes for the two preparation methods. No significant dependence of α_s, neither on the radius nor on the preparation method is observed. These measurements yield a permeability of sucrose for inverted emulsion $\alpha_s(IE) = 6.5 \pm 2 \times 10^{-8}$ m s^{-1} and electroformation $\alpha_s(EF) = 5.5 \pm 2 \times 10^{-8}$ m s^{-1}, which shows that both methods are consistent as they have no significant difference ($p_{value} = 0.27 \gg 0.05$).

Taking into account the high concentration of membrane proteins, these data fit well with previous measurements of α-hemolysin-mediated permeability on fibroblasts where salt permeabilities of 10^{-9} to 10^{-8} m s^{-1} have been measured for a small concentration of pores (1–50 μg ml^{-1}, compared to 100 μg ml^{-1} in the current experiments).[13]

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Downloaded by PhysicoChimie Curie (UMR CNRS 168) on 12 February 2013
Published on 07 February 2013 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C3SM27812C

Table 1 Resulting pore density, ρ, average pore distance $\bar{d}$ and number of experiments N for the three different experimental approaches: contrast loss, micropipet aspiration and hydrodynamic tube pulling. Note that for EPC the error represents the 95% confidence interval of the fit

Method	Lipids	ρ (μm^{-2})	$\bar{d}$ (nm)	N
Contr. loss (EF)	EPC/NTA	125 ± 45	90 ± 16	9
	EPC	34 ± 5	171 ± 12	1
Contr. loss (IE)	EPC/NTA	147 ± 45	82 ± 12	12
	EPC	24 ± 5	208 ± 22	1
Microp. aspiration	EPC/NTA	122 ± 69	90 ± 30	4
Hyd. tube pulling	EPC/NTA	146 ± 67	83 ± 30	4

To calculate the density of pores on the surface of the liposomes, we use the established model of diffusion through small pores by Pappenheimer[14] and Renkin.[15] For a pore of area $A_0 = \pi r^2$ (with r as pore radius), the diffusion depends on the size of the passing molecule, which is defined by the hydrodynamic radius a. Pappenheimer and Renkin showed that the hydrodynamic drag can be taken into account when the actual pore area A_0 is replaced by an effective pore area A_p, defined as: $A_p/A_0 = (1 - (a/r))^2 \times [(1 - 2.104(a/r) + 2.09(a/r)^3 - 0.95(a/r)^5]$. The permeability coefficient depends on the pore density ρ, the diffusion constant $D = k_B T/(6\pi\eta a)$ and the length of the pore l, and is described by $\alpha = \rho D A_p/l$. Using these expressions we can calculate the pore density from the measured permeability by:

$$\rho = \frac{\alpha l}{A_p} \times \frac{6\pi\eta a}{k_B T} \tag{10}$$

with A_p as defined above.

The molecular parameters of the α-hemolysine channel have been measured previously to yield a pore radius of $r = 0.7$ nm and a pore length of $l = 10$ nm.[3,4] Furthermore, the hydrodynamic diameter of sucrose has been determined previously, $a_s = 0.5$ nm.[16] We apply this calculation using a viscosity of $\eta = 1 \times 10^{-3}$ Pa × s to estimate the pore density $\rho_s(\mathrm{EF}) = 124 \pm 45$ μm^{-2} for electroformed liposomes, $\rho_s(\mathrm{IE}) = 147 \pm 45$ μm^{-2} for the inverted emulsion and a respective mean pore distance of $\bar{d}_s(\mathrm{EF}) = 90 \pm 16$ nm, $\bar{d}_s(\mathrm{IE}) = 82 \pm 12$ nm (Table 1). It should be noted that this method directly yields average pore densities of full liposomes, as possible local concentration gradients inside the liposome equilibrate on a timescale of ≈150 ms, while the timescale of sucrose/glucose equilibration across the membrane is 6–12 minutes.

Two other experiments on a pure EPC membrane lead to about five times smaller values of the pore densities (see Table 1), which suggests a dependence of lipid compositions on pore insertion.

3.2 Micropipet aspiration leads to a steady loss of volume

To directly measure the loss of volume in a quasi-equilibrated situation, we aspirate liposomes with a given pressure, and use the volume loss to estimate the pore density. These experiments are performed after equilibration of the sucrose–glucose concentration between the liposome and the buffer. A constant pressure is applied, which forces a constant water flow. Assuming that water permeability increases due to the pores, we thus can estimate the pore number. This measurement does in principle depend on the correct estimation of the volume loss over time.

In each experiment, we set the aspiration pressure in the micropipet ΔP to 0 and bring the micropipet tip close to a liposome membrane. Then we apply a constant aspiration pressure $\Delta P = 160$ Pa and monitor the entry of a liposome tongue inside the micropipet. We calculate the volume $V(t)$ of the liposome from the measurement of micropipet radius $r_p(t)$, the radius of external portion of the liposome $R(t)$ and length of the aspirated portion of the liposome $L(t)$[17] (see Fig. 1C):

$$V(t) = \frac{2\pi r_p^3}{3} + \pi r_p\left(L(t) - r_p\right) + \frac{\pi R(t)^3}{3}\left(2 + 3u(t) - u(t)^3\right) \tag{11}$$

where

$$u(t) = \sqrt{1 - \left(\frac{r_p}{R(t)}\right)^2} \tag{12}$$

Fig. 3 shows the evolution of liposome volumes with time for four examples. We observe that $V(t)$ decreases linearly with time, showing that the flow J is constant for each liposome. Assuming for simplicity that most of the water is leaking though the pores, we can use the expression for the flux through N pores of radius r by:[18]

$$J = N r^3 \Delta P / 3\eta_i \tag{13}$$

where $\Delta P = 2\sigma/R$, and η_i is the viscosity of the fluid inside. This reasoning allows the estimation of the number of pores to be $N^{asp} = 6.1 \pm 3.5 \times 10^4$, which gives a density of 122 ± 69 pores per μm^2 and an average pore distance of 90 ± 30 nm.

While these values are smaller that the measurements of the loss of contrast, they range in the same order of magnitude.

3.3 Hydrodynamic membrane tube pulling

Extrusion of membrane nanotubes from liposomes is used to probe the membrane tension, bending modulus, and

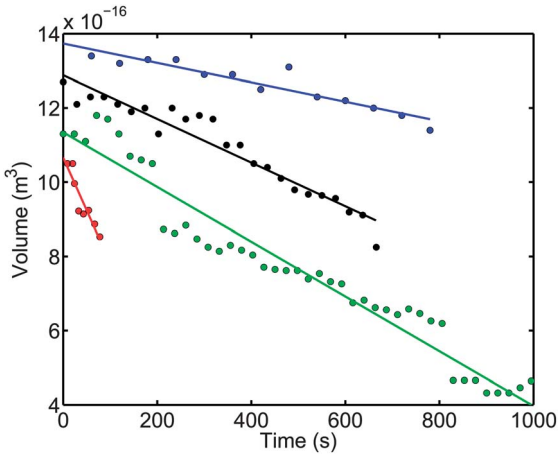


Fig. 3 Loss of volume over time for several examples measured by liposome aspiration. The lines are the linear fit functions, where all have a good fit quality (R-square values between 0.85 and 0.95).

Downloaded by PhysicoChimie Curie (UMR CNRS 168) on 12 February 2013
Published on 07 February 2013 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C3SM27812C

permeability of these liposomes. The critical force needed to extrude a tube depends on the bending modulus of the membrane, κ and the surface tension σ as: $f_{\text{tube}} = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma} = 2\pi\kappa/r_t$, where r_t is the tube radius. In the hydrodynamic tube extrusion (HTE) technique, a controlled fluid flow is used to apply a force on an anchored liposome. Due to the rapid nature of this experiment, we cannot assume equilibrium of the glucose diffusion through the membrane. Therefore, we directly use the flow of water to analyze this experiment. The hydrodynamic force, which equals the drag force on the liposome, is given by: $f_{\text{drag}} = 6\pi\eta RU$, where η is the viscosity of the fluid, R is the radius of the liposome and U is the velocity of the flow. When $f_{\text{drag}} > f_{\text{tube}}$, a tube forms between the anchorage point and the liposome body downstream. Once the tube is formed, its dynamics is governed by the balance between the total friction force, f_{friction} and f_{tube}:

$$f_{\text{friction}} = f_{\text{tube}}$$

$$6\pi\eta R\left(U - \dot{L}\right) = 2\pi\sqrt{2\kappa\sigma} \tag{14}$$

where $\dot{L} = \mathrm{d}L/\mathrm{d}t$ is the tube elongation velocity.

An impermeable liposome behaves like an entropic spring. As the tube elongates, the surface tension increases, leading to an augmentation of f_{tube} and decrease of $\dot{L}$. When $\dot{L} = 0$, the tube reaches a stationary length, L_∞, and the tube no longer elongates. The surface tension and the bending modulus of an impermeable liposome can hence be obtained by finding L_∞, as a function of U, as reported previously.[12] In contrast, for permeable liposomes, the membrane tension stays constant and the tube is extruded at constant velocity without reaching a stationary length[19] (Fig. 4). The elongation of the tube is accompanied by a decrease of the volume V of the liposome as the fluid inside the liposome leaks out with a rate given by: $J = -\mathrm{d}V/\mathrm{d}t = -4\pi R^2 dR/dt$. Using the area conservation criteria, $-8\pi R\dot{R} = 2\pi r_t\dot{L}$, and the expression of the flux (eqn (13)) we get the following relationship between the number of pores as a function flow velocity U and tube extrusion speed $\dot{L}$:

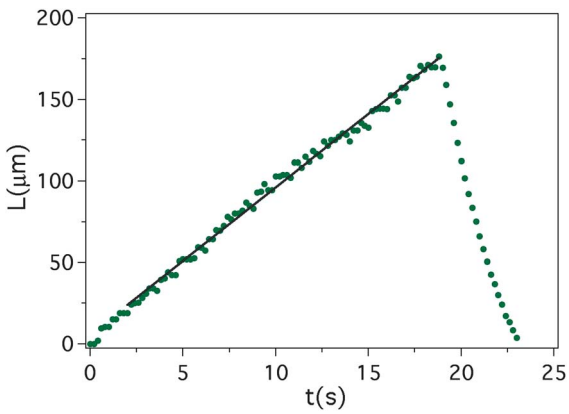


Fig. 4 Hydrodynamic tube extrusion of a liposome decorated with α-hemolysin pores. The tube extends with $\dot{L} = 9$ μm s^{-1}, at $U = 125$ μm s^{-1} and retracts once the flow stops. The liposome radius is $R = 10$ μm.

$$N = \frac{\pi\kappa^2\eta_i}{9\eta^3 Rr^3}\frac{\dot{L}}{\left(U - \dot{L}\right)^3} \tag{15}$$

Taking $r = 0.7$ nm for an α-hemolysin pore, $\kappa = 10\ k_BT$, and $\eta_i = \eta_o = 0.9 \times 10^{-3}$ Pa × s after buffer equilibration, we obtain N using eqn (15). The pore density is defined as $\rho = N/A$, where A is the area of the liposome at rest. Applying this third non-equilibrium technique, we find a value of 146 ± 67 μm^{-2} for the pore density and an average distance between the pores of 83 ± 30 nm.

These findings match the results obtained from the micropipet aspiration measurements, and are in the same order of magnitude as the measurements obtained from the loss of contrast method.

4 Conclusion

We provide three different experimental ways of estimating the density of α-hemolysin pores that auto-assemble into a liposome at a given concentration of protein. Our measurements give consistent estimates of the pore density and average pore distance, thus validating the three measurements. The different ways of experiments used the loss of refractive index after pore addition, the loss of volume during aspiration in a micropipet and the hydrodynamic extrusion of a membrane tube. Hence, we probed the initial non-equilibrium situation, the long term quasi-equilibrium during aspiration, which took up to 15 minutes, and the extension of membrane tubes, which happened on the timescale of up to 20 seconds.

The measurements of pore density and average pore distance presented show that even under variable preparation conditions, three different measurements produce comparable and consistent values that are on the order of 100 pores per μm^2 for EPC/NTA lipids. Nevertheless, it turns out that liposomes formed by pure EPC lipids seem to have a smaller pore density as compared to vesicles formed using EPC/NTA mix lipids (Table 1). This shows that α-hemolysin adsorption appears to be sensitive to membrane composition.

Acknowledgements

The authors would like to thank Pietro Cicuta, Jean-François Joanny, Martin Lenz and Matthias Bussonnier for helpful discussion and Patricia Bassereau for support in the micropipet aspiration experiments. TB was supported by the ANR (ANR-11-JSV5-0002). CC was supported by the ANR "Programme Blanc" (ANR-08-BLAN-0012-12 and ANR- 09-BLAN-0283). JL was supported by AXA Research Fund.

References

1 L. Pontani, J. Van der Gucht, G. Salbreux, J. Heuvingh, J. Joanny and C. Sykes, *Biophys. J.*, 2009, **96**, 192–198.
2 V. Noireaux and A. Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 17669–17674.
3 L. Ma and S. L. Cockroft, *ChemBioChem*, 2010, **11**, 25–34.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

4 G. Menestrina, *J. Membr. Biol.*, 1986, **90**, 177–190.
5 L. Song, *Science*, 1996, **274**, 1859.
6 L. Movileanu, *Trends Biotechnol.*, 2009, **27**, 333–341.
7 L. Mathivet, S. Cribier and P. Devaux, *Biophys. J.*, 1996, **70**, 1112–1121.
8 M. Gogler, T. Betz and J. A. Kas, *Opt. Lett.*, 2007, **32**, 1893–1895.
9 T. Betz, M. Lenz, J. Joanny and C. Sykes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 15320–15325.
10 F. Gittes and C. F. Schmidt, *Opt. Lett.*, 1998, **23**, 7–9.
11 T. A. Nieminen, V. L. Y. Loke, A. B. Stilgoe, G. Knner, A. M. Braczyk, N. R. Heckenberg and H. Rubinsztein-Dunlop, *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.*, 2007, **9**, S196–S203.
12 N. Borghi, O. Rossier and F. Brochard-Wyart, *Europhys. Lett.*, 2003, **64**, 837–843.
13 M. J. Russo, H. Bayley and M. Toner, *Nat. Biotechnol.*, 1997, **15**, 278–282.
14 J. R. Pappenheimer, E. M. Renkin and L. M. Borrero, *Am. J. Physiol.*, 1951, **167**, 13–46.
15 E. M. Renkin, *J. Gen. Physiol.*, 1954, **38**, 225–243.
16 S. G. Schultz, *J. Gen. Physiol.*, 1961, **44**, 1189–1199.
17 K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham and E. Evans, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 321–327.
18 J. Happel and H. Brenner, *Low Reynolds Number Hydrodynamics: with Special Applications to Particulate Media*, Springer, 1st edn, 1983.
19 N. Borghi, S. Kremer, V. Askovic and F. Brochard-Wyart, *Europhys. Lett.*, 2006, **75**, 666–672.

Downloaded by PhysicoChimie Curie (UMR CNRS 168) on 12 February 2013
Published on 07 February 2013 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C3SM27812C

Chapitre 4

Transformation des tubules de Shiga par l'endophiline-A2

Sommaire

4.1 La famille des toxines de Shiga **78**
4.1.1 Structure de la toxine de Shiga 79
4.1.2 Interaction avec les membranes 79
4.1.3 Internalisation de la toxine de Shiga 80
4.2 L'endophiline **82**
4.2.1 Les protéines à domaine BAR 82
4.2.2 Structure 83
4.3 Résultats **85**
4.3.1 Interaction de la toxine de Shiga avec une membrane modèle . . 86
4.3.2 Interaction de l'endophiline-A2 avec une membrane modèle . . . 86
4.3.3 Effet de l'endophiline-A2 sur les tubulations de Shiga 91
4.4 Conclusion **94**
4.5 Article 2 : Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis **95**

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été menés en collaboration avec le groupe "Trafic, Signalisation et Ciblage Intracellulaires" de l'unité de biologie cellulaire de l'Institut Curie (UMR 144) et le groupe "Membranes et fonctions cellulaires" de notre unité (UMR 168). Durant l'endocytose, les invaginations formées à la surface d'une cellule sont détachées de la membrane plasmique, formant ainsi des vésicules. Ce processus d'internalisation nécessite un apport d'énergie afin de réduire, puis de scissionner, le tubule de membrane liant l'invagination à la surface de la cellule. Dans les phénomènes d'endocytose dépendants de la clathrine (FIG :1.3), qui est une protéine qui impose une courbure initiale à la membrane, l'étape de scission est effectuée par la dynamine aidée de protéines à Bin-Amphiphysin-Rvs domaine (BAR domaine) comme l'endophiline. La dynamine se lie au tube de membrane et entraine sa scission par torsion.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à des phénomènes d'endocytose qui ne dépendent pas de la clathrine et peu de la dynamine. Ceux-ci sont mis en évidence par la toxine de Shiga qui utilise de multiples voies d'endocytose pour infecter les cellules. Une étude antérieure de l'équipe, menée avec les mêmes collaborateurs, a permis de montrer que l'endocytose de la toxine de Shiga dépendait directement de la polymérisation de l'actine [Römer *et al.* 2010]. Toutefois, aucune étude n'avait encore été menée sur le rôle des protéines à domaine BAR dans cette endocytose indépendante de la voie clathrine. Il s'agit de l'objet de mon étude. Nous avons donc développé un système *in vitro* de liposomes pour mettre en évidence les rôles complémentaires de la toxine de Shiga et des protéines à domaine BAR. Ce système pourrait ultérieurement être utilisé pour étudier l'effet de la polymérisation de l'actine.

4.1 La famille des toxines de Shiga

La toxine de Shiga est une famille d'exotoxines dont la structure et le mode d'infection sont très proches [Johannes & Mayor 2010]. Parmi elles on trouve la toxine de Shiga qui porte le même nom que la famille de toxines à laquelle elle appartient. Elle est produite par la bactérie *Shigella dysenteriae* découverte en 1897 par le microbiologiste Kiyoshi Shiga [Johannes & Römer 2010]. Il existe aussi les "Shiga-like" toxines produites par *enterohaemorrhagic Escherichia coli* qui ont été mises en évidence par O'brien dans les années 1980 [O'Brien *et al.* 1984]. Les deux sous-groupes de cette famille de toxines sont responsables, chez l'homme, de diarrhées qui évoluent souvent en dysenterie et colites hémorragiques, et peuvent ensuite engendrer d'autres pathologies extra-intestinales telles que des insuffisances rénales aigües, une anémie hémolytique, ou bien des déficiences neuronales [Proulx *et al.* 2001], [Trachtman *et al.* 2012], [Mele *et al.* 2014]. L'infection par les toxines Shiga se passe en trois étapes. Tout d'abord la toxine s'ancre à la membrane plasmique et la déforme, ensuite elle se fait internaliser par la cellule puis relarguer dans le cytosol. Dans cette étude nous avons étudié l'internalisation de la toxine.

Une fois que la toxine de Shiga se trouve dans le cytosol d'une cellule elle est capable d'inhiber directement la synthèse protéique, induisant la mort cellulaire. Cette capacité lui vient de son activité ARN-N-Glycosidase qui lui permet de reconnaître et de cliver le domaine α-Sarcin au bout 3' du ribosome 28S. Cette dégradation spécifique d'une partie de la grande sous-unité du ribosome (60S), d'environ 400 nucléotides avant la fin de la séquence du ribosome, empêche alors la production de nouvelles protéines [Saxena *et al.* 1989].

4.1.1 Structure de la toxine de Shiga

La toxine de Shiga (StxB) utilisée dans cette étude est celle provenant de la bactérie *Shigella dysenteriae*. De par sa structure elle est classée dans la famille des toxines AB. Cette désignation provient de la fonction des deux sous-unités qui la composent, l'une est cytotoxique ("active") alors que l'autre sert à ancrer la toxine, via un récepteur, à la surface d'une membrane ("binding"). StxB possède cinq sous-unités B de 7,7 kDa chacune, pour une unique unité A de 32 kDa, elle est du type AB_5. La structure cristallographique de cet hexamère met en évidence une conformation en anneau, constituée par les cinq sous-unités B, qui entourent la sous-unité A. La partie C-terminal de la sous-unité A s'encastre au milieu de cinq feuillets β formés par l'homopentamère B [Fraser *et al.* 1994]. La partie A est elle-même composée de deux domaines nommés A1 et A2 qui sont liés de manière covalente par des ponts disulfures (FIG :4.1). L'activité ARN-N-Glycosidase de la toxine est uniquement portée par le domaine A1. Pour notre étude, focalisée sur l'ancrage de la toxine et son internalisation, seule la sous-unité B est donc indispensable.

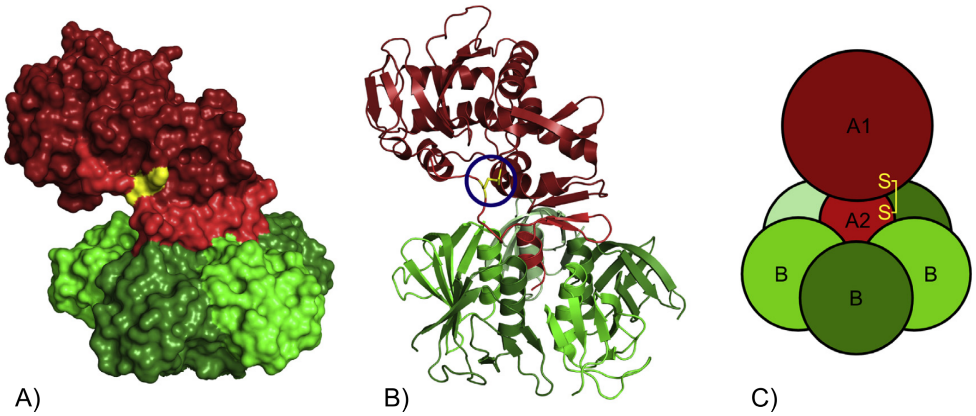


FIGURE 4.1 – A-B) Structure cristallographique de StxB. C) Représentation shématique de la toxine. En rouge sont représentés les deux domaines de la sous-unité active (A1 rouge foncé, A2 rouge clair). Les liaisons disulfures sont représentées en jaune et entourées, sur la représentation en ruban, pour plus de visibilité. Les cinq unités B sont représentées en vert, entourant la partie active. D'après [Fraser *et al.* 1994] et [Sandvig *et al.* 2014].

4.1.2 Interaction avec les membranes

Grâce à la présence de sa sous-unité B, StxB est capable de se lier aux membranes via un récepteur spécifique, le globotriaosylceramide (Gb3). Il s'agit d'un glycosphingolipide que l'on trouve principalement dans les cellules du rein, les cellules endothéliales

microvasculaires, les plaquettes et le lymphocytes B. Par ailleurs, et c'est aussi ce qui fait de StxB un élément de recherche en thérapie contre le cancer, le Gb3 est surexprimé dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses chez l'homme (colorectal, du sein, des ovaires). Ce lipide possède deux queues hydrophobes et une tête composée de trois glucides (FIG :4.2).

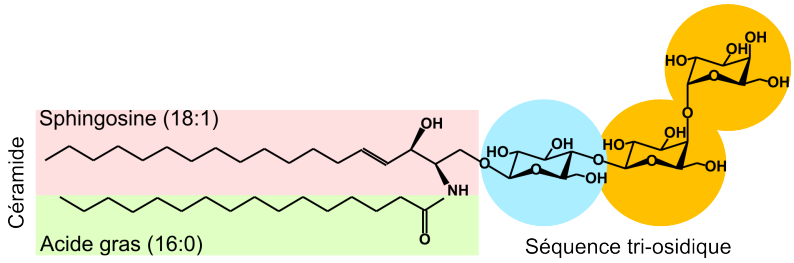


FIGURE 4.2 – Structure du glycosphingolipide globotriaosylceramide : Gb3. La tête hydrophile du lipide est composée de trois cycles formant la séquence tri-osidique (un glucose et deux galactoses). Au niveau des queues hydrophobes la présence d'un acide gras lié à la sphingosine via une liaison amide lui vaut le nom de lipide céramide. D'après [Sandvig *et al.* 2014].

Chaque fragment de la sous-unité B de la toxine possède trois sites de liaison au Gb3 qui n'interagissent pas entre eux. Au total, StxB dispose donc de 15 sites d'attache à une membrane. Cependant, ces différents sites sont à séparer en deux groupes qui n'interagissent pas de la même manière (FIG :4.3,B). En effet, 5 sites se lient à une tête du lipide Gb3 uniquement si celle-ci est parallèle à la surface de la membrane, alors que les dix autres sites sont capables de se lier à un Gb3 dont la tête est perpendiculaire à la membrane. La présence de cholestérol dans la membrane induit une telle rotation des têtes du Gb3, qui passent alors d'une disposition perpendiculaire à une disposition parallèle à la membrane (FIG :4.3,A). Ces différentes morphologies des têtes du Gb3 sont connues pour engendrer des variations d'association de la toxine. En effet, les différents sites de liaison de la toxine ne possèdent pas la même affinité pour le Gb3 [Mahfoud *et al.* 2010]. Toutefois, grâce à la présence de ces multiples sites la toxine possède une constante d'association élevée, pour donner un exemple, sur les cellules intestinales du lapin elle est de l'odre de $10^9 M^{-1}$ [Fuchs *et al.* 1986].

4.1.3 Internalisation de la toxine de Shiga

Une fois que StxB se lie à une membrane, il lui faut encore trouver le moyen d'internaliser sa sous-unité active A au sein du cytosol. Dans ce domaine, la toxine est extrêmement efficace puisqu'elle est capable d'emprunter une grande variété de chemins pour parvenir à pénétrer dans la cellule (FIG :4.4). Elle est capable d'emprunter la voie

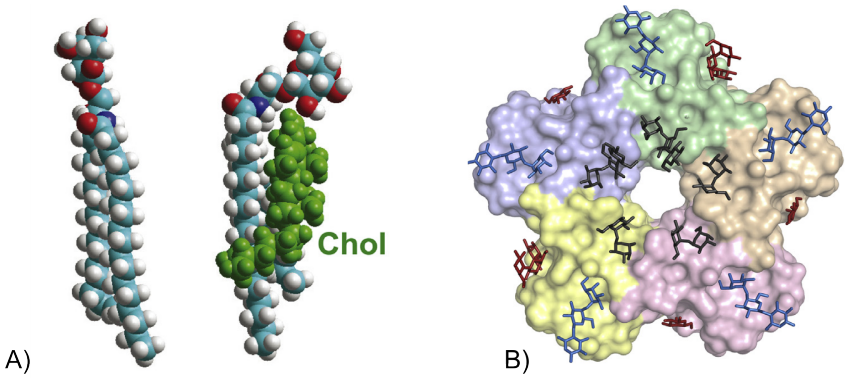


FIGURE 4.3 – A) Effet du cholestérol (en vert) sur la tête tri-osidique du Gb3 qui passe de parallèle à perpendiculaire à la surface de la membrane. B) Représentation des 5 fragments constituant la sous-unité B de StxB. Chaque fragment possède trois sites de liaison potentiels à un lipide Gb3. La tête tri-osidique du Gb3 est représentée sous trois couleurs différentes afin de différencier 3 types de sites. Ces sites sont scindés en deux catégories dont l'interaction avec la membrane est possible lorsque la tête du Gb3 est perpendiculaire (rouge et noir) ou parallèle (bleu) à la membrane. D'après [Sandvig *et al.* 2014].

d'endocytose dépendant de la clathrine, cependant l'internalisation de la toxine est toujours possible même lorsque cette voie d'accès est inhibée [Sandvig *et al.* 1989] et [Lauvrak *et al.* 2004]. La toxine est capable d'induire des déformations de la membrane plasmique résultant d'un rassemblement de lipides Gb3 induit par la toxine elle-même. Contrairement à la formation de tubulations à la membrane par la toxine, la scission de ces invaginations nécessite, de la part de la cellule hôte, la mise en place de processus actifs. Des expériences *in vitro* sur liposomes, menées au sein de l'équipe "biomimétisme du mouvement cellulaire" et en collaboration avec le groupe "Trafic, signalisation et ciblage intracellulaires" de l'Institut Curie, ont permis de mettre en évidence à la fois l'importance de la composition de la bicouche lipidique et de la polymérisation du cortex d'actine sur la scission des tubes de Shiga toxine [Römer *et al.* 2007].

Une fois entrée dans la cellule, StxB est localisée au niveau des endosomes précoces et de recyclage. Elle a également été détectée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui suggère fortement que la toxine se déplace de façon rétrograde par rapport à la voie d'exocytose classique [Sandvig *et al.* 1992]. La toxine est directement transportée, des endosomes précoces et de recyclage, vers l'appareil de Golgi puis au réticulum endoplasmique, évitant de ce fait la voie d'endocytose usuelle [Johannes & Popoff 2008]. Une fois arrivée au réticulum endoplasmique, la partie active de la toxine est relarguée dans le cytosol, où elle inhibe alors la synthèse protéique

(FIG :4.4).

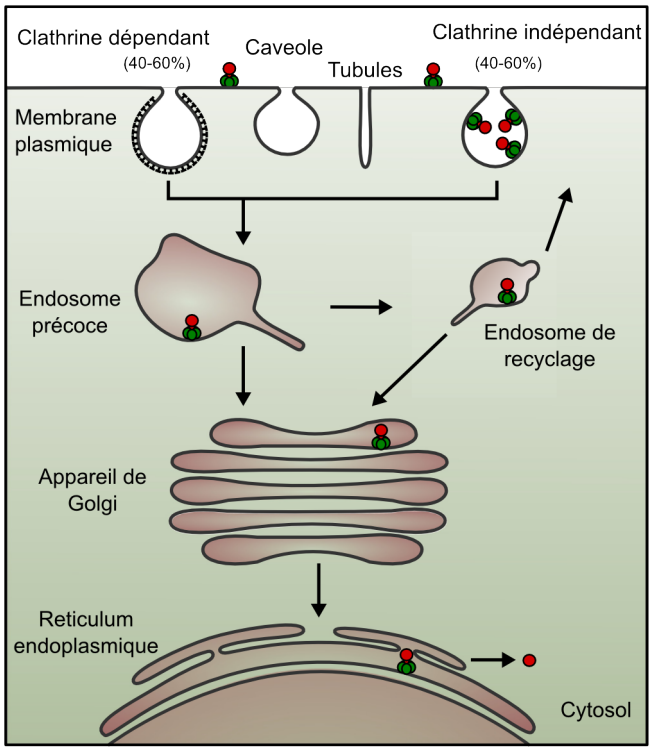


FIGURE 4.4 – Endocytose et transport intracellulaire de StxB. La toxine, représentée en vert et rouge, peut être internalisée par la voie d'endocytose dépendant de la clathrine. Cependant, une certaine proportion de StxB peut être internalisée par des voies indépendantes de la clathrine. Une fois internalisée, StxB est transportée jusqu'au réticulum endoplasmique en suivant la voie rétrograde, on la retrouve donc au niveau des endosomes précoces de l'appareil de Golgi et enfin au réticulum endoplasmique où elle se sépare de sa partie cytotoxique (rouge) qui est relarguée dans le cytosol. Adapté de [Sandvig *et al.* 2014].

4.2 L'endophiline

4.2.1 Les protéines à domaine BAR

L'endophiline est un groupe de protéines de la famille des domaines BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs domaine). Il s'agit de protéines contenant un domaine de liaison aux membranes (BAR). Cette liaison est assurée par des interactions électrostatiques entre

les charges négatives, portées par la tête des lipides, et les charges positives portées par le domaine BAR. Certains membres de cette famille de protéines possèdent en plus des hélices amphipatiques qui s'ancrent dans les membranes. Les protéines à BAR domaine sont extrêmement impliquées dans les déformations membranaires, notamment lors du trafic intracellulaire [Mim & Unger 2012]. En effet, elles sont capables d'induire ou de sentir les déformations membranaires. La famille des BAR protéines se divise en trois grandes catégories en fonction du rayon de courbure (R) de la déformation membranaire avec laquelle elles interagissent : les N-BAR (R$\sim$10 nm), les F-BAR (R$\sim$50 nm et plus) et les I-BAR (R$\prec$0) [Suetsugu *et al.* 2010]. Les endophilines appartiennent aux N-BAR protéines (FIG :4.5).

4.2.2 Structure

Le groupe des endophilines est lui-même composé de cinq membres regroupés en deux catégories, les endophilines A1, A2, A3 et les endophilines B1, B2. Les endophilines A sont connues pour êtres impliquées dans les phénomènes d'internalisation de la membrane plasmique alors que les endophilines B sont associées aux membranes des organelles. Même si la structure complète des ces protéines reste encore à découvrir, les deux catégories de protéines semblent très proches. Dans cette étude nous avons travaillé avec l'endophiline-A2 notée endoA2.

Toutes les endophilines possèdent un domaines BAR en N-terminal, une partie intermédiaire variable et un domaine SH3 en C-terminal. Le domaine BAR, en plus de permettre à la protéine de se lier à une membrane ou d'induire sa déformation, permet la dimérisation de la protéine. Chaque monomère est constitué de 3 hélices α. L'hélice amphipatique H0 se trouve au niveau N-terminal de la protéine qui s'incorpore dans les membranes plasmiques. Une autre hélice (H1I), provenant de la partie concave de la protéine est aussi capable de s'insérer dans la membrane en plus de H0 [Gallop *et al.* 2006], [Kjaerulff *et al.* 2011]. C'est la structure centrale de la protéine qui reste encore inconnue (FIG :4.6).

La constante de dimérisation du domaine BAR de la protéine vaut $K_D = 10^{-6}$M, or la concentration cytosolique de la protéine est d'environ 1 µM et l'on sait qu'il s'agit d'un équilibre monomères-dimères. On peut donc écrire :

$$K_D = \frac{[A]^2}{[A-A]} = 10^{-6} \tag{4.1}$$

et,

$$1\mu\text{M} = [A] + 2[A-A] \tag{4.2}$$

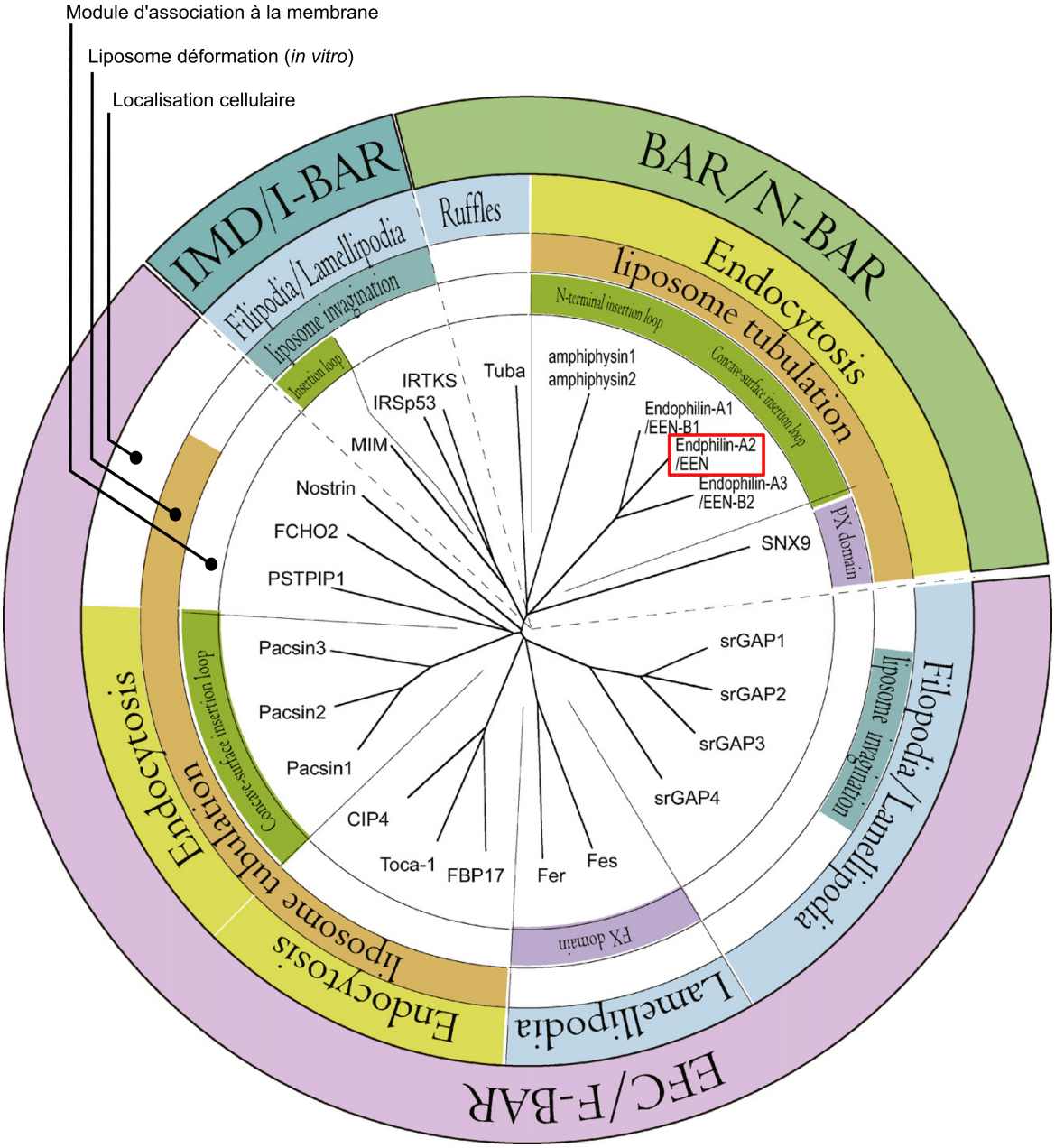


FIGURE 4.5 – Diagramme représentant les membres de la super-famille des protéines à domaine BAR , leur localisation au niveau des structures cellulaires, le domaine par lequel elles se lient aux membranes et le mode de déformation qu'elles engendrent sur un liposome. L'endophiline-A2, utilisée dans cette étude, est mise en évidence par un cadre rouge. D'après [Suetsugu *et al.* 2010].

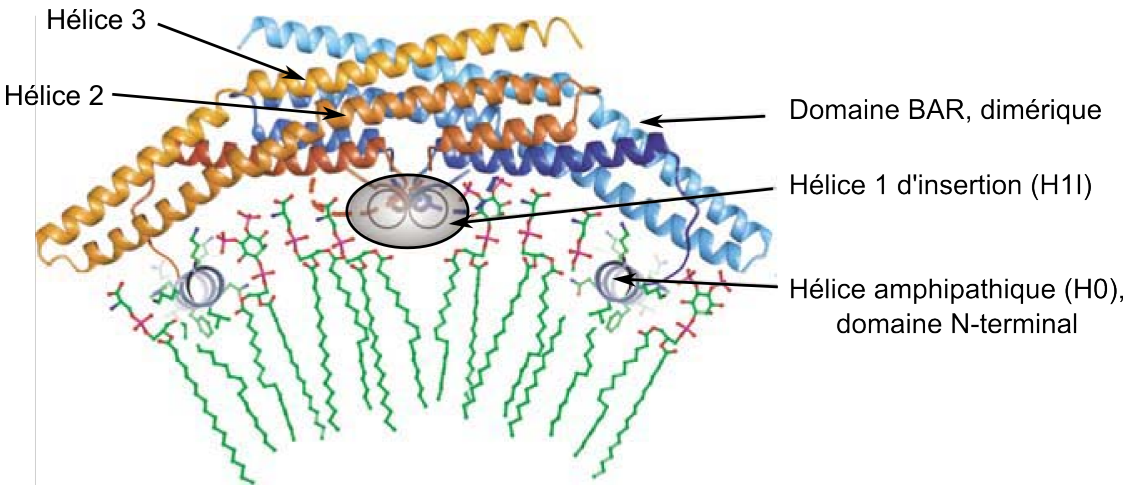


FIGURE 4.6 – Représentation de la liaison de l'homodimère d'endophiline à une membrane plasmique. Chaque monomère d'endophiline est représenté par une couleur (jaune ou bleue). Les différentes hélices constituant la protéine sont indiquées. On remarquera la manière dont les deux hélices amphipathiques (H0 et H1I) s'insèrent dans la membrane, induisant une courbure à cette dernière. D'après [Gallop *et al.* 2006].

Ce qui indique que la forme prédominante en solution serait le monomère. Cependant, des études sur membranes indiquent que le dimère devient la forme prédominante [Gallop *et al.* 2006] et [Jao *et al.* 2010].

Par ailleurs, le domaine SH3 porté par l'endophiline est capable de se lier à la dynamine ou encore à N-WASP qui est un facteur promoteur de la nucléation de l'actine-F (chapitre 1), suggérant un lien entre la forme des déformations qu'elle induit et la scission ou la machinerie de polymérisation de l'actine [Meinecke *et al.* 2013].

4.3 Résultats

Les protéines à domaine BAR sont connues pour reconnaître et interagir avec des membranes courbées. StxB est capable de former des invaginations dans la membrane plasmique de manière complètement indépendante de la clathrine. Les résultats préliminaires de l'équipe de Ludger Johannes montrent que l'endoA2 colocalise avec les invaginations créées par la toxine et induit un changement morphologique des tubules. Le but de l'étude que j'ai menée consistait à déterminer le rôle de l'endoA2 sur la morphologie et la scission des tubulations induites par StxB.

4.3.1 Interaction de la toxine de Shiga avec une membrane modèle

Dans un premier temps il a fallu reproduire l'interaction de StxB avec une membrane modèle. Pour cela je suis reparti du système mis au point au sein de notre équipe, pour une précédente étude [Römer *et al.* 2010]. Il s'agit de former des liposomes par émulsion inverse avec une composition lipidique permettant la liaison de la toxine. On a d'abord testé l'encapsulation de 40 µg/mL de StxB dans des liposomes formés par émulsion inverse sans le récepteur Gb3 à la membrane (FIG :4.6,A & B). Avec cette composition lipidique, comme on pouvait s'y attendre, malgré la présence de StxB à l'intérieur du liposome, on n'observe aucune interaction spécifique avec la membrane. Cependant, après l'ajout de 5% molaire de lipide Gb3 dans la composition lipidique, on observe une interaction spécifique entre la membrane et la toxine, que celle-ci soit injectée à l'extérieur du liposome (FIG :4.6, C) ou encapsulée (FIG :4.6, D). Une fois l'interaction de la toxine correctement reproduite nous avons ajouté à ce système l'endophiline-A2.

La présence de StxB sur des membranes contenant le lipide Gb3 induit des déformations membranaires (FIG :4.6, C & D). Ainsi, après une dizaine de minutes on peut voir apparaître des invaginations dans lesquelles StxB est bien présente. C'est ce que l'on nomme les tubules de Shiga. Ils sont enroulés sur eux-même. Si StxB est encapsulée ces tubules pointeront vers l'extérieur du liposome alors que si l'on injecte StxB à l'extérieur les tubules de Shiga seront dirigés vers l'intérieur du liposome.

4.3.2 Interaction de l'endophiline-A2 avec une membrane modèle

Le deuxième temps a consisté à adapter le mélange lipidique afin de permettre à l'endoA2 d'interagir elle aussi avec la membrane du liposome. Dans la littérature, on trouve plusieurs compositions membranaires utilisées pour l'étude de l'endophiline. Ainsi, dans l'étude de [Gortat *et al.* 2012] les liposomes sont préparés à partir de lipides extraits du cerveau de bovins (BE). Il s'agit d'un mélange de lipides dont la composition n'est connue que partiellement (TABLE :4.3.2). Dans d'autres cas du Pi(4,5)P2 est ajouté [Boucrot *et al.* 2012] pour ne donner que deux exemples. Mais, à ce jour, aucune étude n'a encore utilisé la technique de l'émulsion inverse pour former les liposomes.

J'ai donc essayé d'obtenir des liposomes dont la composition membranaire serait composée uniquement de BE, à l'aide de protocole d'émulsion inverse. Cependant, je n'ai jamais pu obtenir de liposomes. Je formais des agrégats de lipides alors que j'obtenais des micelles dans la solution d'huile. A l'opposé, il est assez facile d'obtenir une grande quantité de liposomes à l'aide de l'EPC. L'idée suivante a donc consisté à

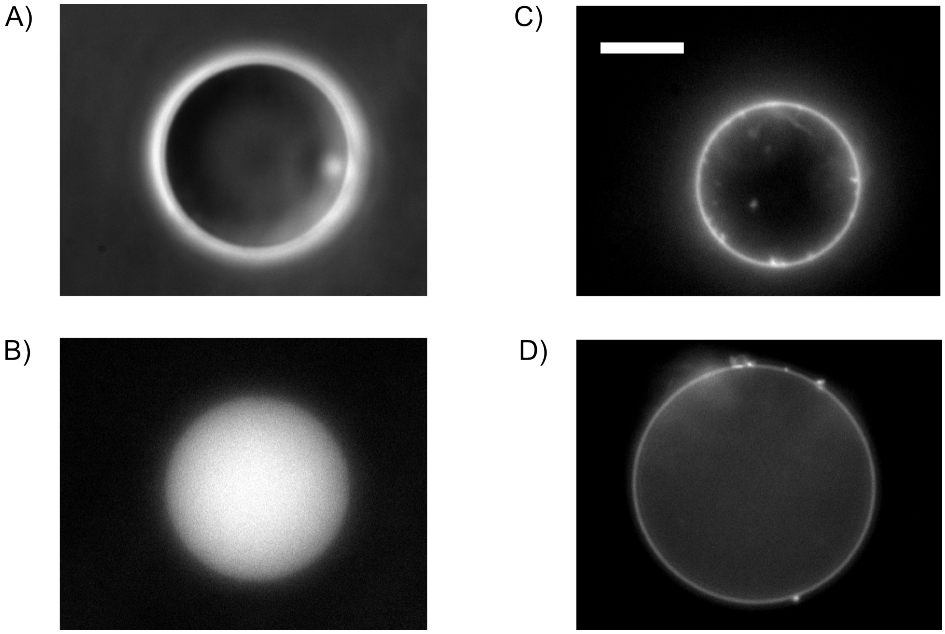


FIGURE 4.7 – Interaction entre une membrane de liposome et StxB fluorescente. A)-B) liposome n'ayant pas de lipide Gb3 dans la composition de sa membrane (70% molaire d'EPC, 30% molaire de cholestérol) et dans lequel la toxine de Shiga est encapsulée. A) Contraste de phase. B) Epifluorescence. C) et D) Les liposomes contiennent du Gb3 dans leur membrane (65% molaire d'EPC, 30% molaire de cholestérol et 5% molaire de Gb3). Que l'on injecte la toxine de Shiga dans la solution extérieure C) ou qu'elle soit encapsulée D), elle interagit avec les membranes et induit des déformations, sous formes de petits tubules repliés sur eux-même. Barre d'échelle 10 µm.

former des liposomes en mélangeant le BE à de l'EPC. De cette manière nous avons pu former quelques liposomes, mais malgré les différents ratio BE/EPC utilisés, nous n'avons pas pu obtenir de manière reproductible et en suffisamment grande quantité des liposomes par émulsion inverse.

Composants	**%massique**
Phosphatidylcholine PC	9,6
Phosphatidyléthanolamine PE	16,7
Phosphatidylinositol PI	1,6
Phosphatidylsérine PS	10,6
Acide phosphatidique PA	2,8
Inconnus	58,7
Total	100

TABLE 4.1 – Composition lipidique du Brain Total Extract. PC donne sa structure de base à la membrane et maintient son caractère perméable. PE aussi connu sous le nom de céphaline, est particulièrement présent dans les cellules formant la substance blanche du cerveau, son rôle n'est pas encore déterminé. PI est un lipide reconnu par beaucoup de protéines liées au trafic cellulaire, il peut notamment être phosphorylé par des kinases. PS est chargé négativement, il est généralement présent dans le feuillet interne des membranes. PA quant à lui est connu pour faciliter la vesiculation/fusion des membranes.

Afin de stabiliser au maximum les membranes, tout en optimisant la quantité de BE accessible à l'endoA2, nous avons essayé de former des liposomes à membrane asymétrique, comme le permet la technique d'émulsion inverse [Pautot *et al.* 2003a]. Former des micelles inverses de BE n'était pas l'étape limitante, nous avons donc gardé une membrane interne composée à 100% de BE. Pour optimiser le rendement de la formation des liposomes nous avons uniquement utilisé l'EPC pour former le feuillet externe des liposomes (FIG :4.8). Le protocole plus détaillé se trouve en Annexe E.

Grâce a cette technique, nous avons obtenu des liposomes dont le feuillet interne est entièrement constitué de BE alors que le feuillet externe contient uniquement de l'EPC (FIG :4.9,A). Il en est de même lorsque l'on ajoute 5% de Pi(4,5)P2 à 95% de BE pour composer le feuillet interne. Sachant qu'il fallait ensuite insérer du Gb3 dans la composition du feuillet externe, nous avons crée un mélange lipidique composé à 50% de BE/Pi(4,5)P2 similaire au feuillet interne, et à 50% d'EPC/Gb3 (FIG :4.9, C) qui donnait encore une fois un bon rendement de liposomes. Cette composition était un compromis entre le rendement de liposomes formés et la nécessité qu'ils puissent permettre à la fois à l'endoA2 et à StxB de se lier de part et d'autre de la membrane.

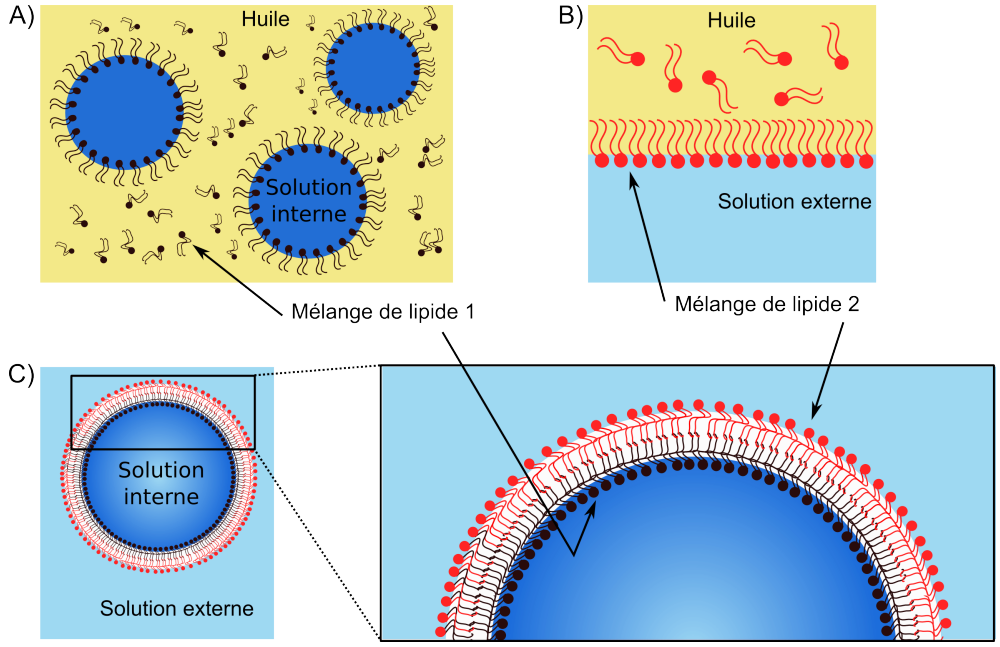


FIGURE 4.8 – Principe de l'émulsion inverse pour former des liposomes asymétriques. A) Un premier mélange de lipides est utilisé pour constituer le feuillet interne. B) Un deuxième mélange de lipides est utilisé à l'interface entre la solution externe et l'huile qui servira à constituer le feuillet externe des liposomes lors de la centrifugation. C) Le liposome une fois formé avec deux feuillets lipidiques différents. A droite on représente un agrandissement de la membrane du même liposome.

Nous avons ensuite encapsulé l'endoA2 qui interagissait bien avec la membrane interne, comme nous le souhaitions. Cependant aucune déformation membranaire n'est apparue, même après plus de 30 minutes. L'endoA2, bien qu'étant une protéine N-BAR, ne semble donc pas capable, à elle seule, de produire des déformations membranaires.

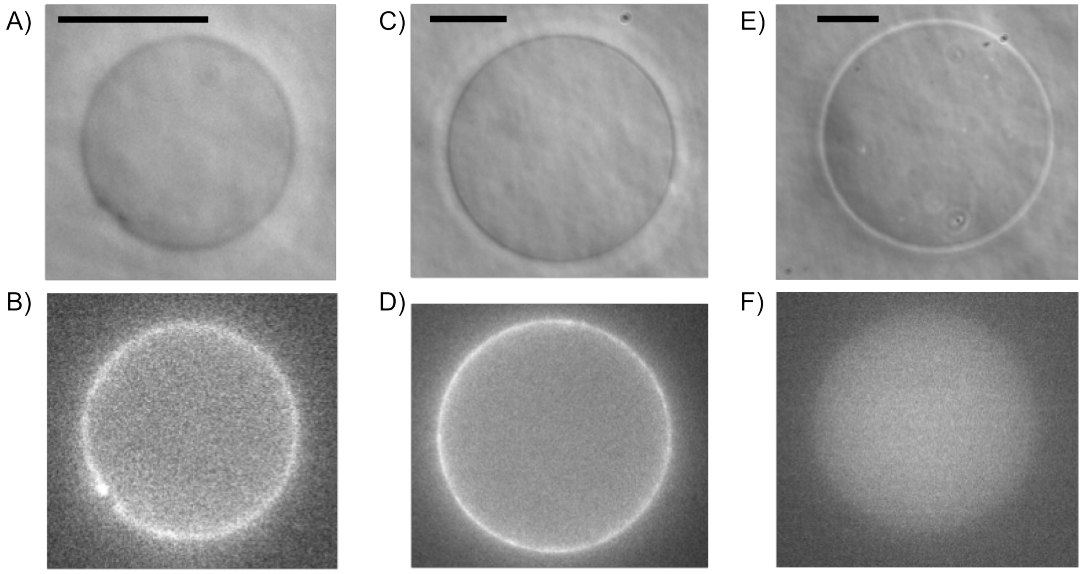


FIGURE 4.9 – L'endophiline-A2 fluorescente est encapsulée dans les liposomes à 2 µM. A)-C)-E) Image au contraste de phase d'un liposome contenant l'endophiline. B)-D)-F) Le même liposome est observé au microscope à fluorescence. A) Feuillet interne 100% BE, feuillet externe 100% EPC. C) Feuillet interne 100% BE, feuillet externe 35% EPC, 62,5% BE, 1,25% Gb3 et 1,25% Pi(4,5)P2. Les compositions en A) et C) permettent d'obtenir des liposomes avec une liaison de l'endophiline sur leur feuillet interne. E) Le liposome est uniquement composé d'EPC, on ne détecte aucune interaction membranaire. Dans tous les cas, l'endophiline-A2 n'induit aucune déformation de la membrane. Barre d'échelle 5 µm.

L'ajout du lipide Gb3 à la composition du feuillet externe ne semblait pas modifier le comportement de l'endoA2 avec la membrane. Ce résultat laissait présager la possibilité d'ajouter de l'autre côté de la membrane, dans la solution extérieure, StxB afin que celle-ci se lie à son récepteur. De cette manière nous aurions un système minimaliste composé de l'endoA2 à l'intérieur du liposome et StxB à l'extérieur, reproduisant la géométrie physiologique. Cette configuration n'a pas permis d'obtenir de tubulation de Shiga, même si l'on augmente la quantité de Gb3 dans la composition du feuillet externe. Après une discussion avec Henri-François, de l'équipe de Ludger Johannes, il est apparu que sur les expériences *in vivo*, il observait le recrutement de l'endoA2 une fois les tubulations de Shiga formées. Nous avons alors inversé la géométrie de nos

liposomes, de manière à ce que StxB interagisse avec le feuillet interne et que l'endoA2 puisse se lier au feuillet externe. De cette manière on peut laisser le temps à StxB de former des tubulations (environ une dizaine de minutes) avant d'injecter dans la solution extérieure l'endoA2.

Pour satisfaire à la totalité de ces contraintes, dans la suite, ainsi que dans l'article, nous avons utilisé les compositions lipidiques suivantes :

- feuillet interne : 65% EPC, 30% cholestérol et 5% Gb3 (en % molaire)
- feuillet externe : 95% BE et 5% PI(4,5)P2 (en % massique)

De cette manière on optimise à la fois l'interaction de l'endoA2 à la surface extérieure du liposome et l'interaction de StxB à la surface interne tout en ayant un bon rendement de formation des liposomes.

4.3.3 Effet de l'endophiline-A2 sur les tubulations de Shiga

L'endoA2 seule, ne forme aucune tubulation en accord avec la géométrie inversée présentée précédemment (FIG :4.10,i). De manière un peu plus inattendue, l'ajout dans la solution extérieure au liposome de StxB ne permettait pas d'obtenir de tubulation lorsque l'endoA2 était encapsulée à l'intérieur. L'endoA2 semble empêcher StxB de former ces tubules. Par contre, il est possible de mettre en évidence un effet coopératif de ces deux protéines dans la configuration inversée, avec la toxine encapsulée dans le liposome et l'endoA2 à l'extérieur.

La présence de StxB dans le liposome induit la formation de tubules orientés vers l'extérieur, comme attendu (FIG :4.10,ii). Une fois ces tubules formés, l'injection dans la solution extérieure de l'endoA2 change la morphologie des tubules qui deviennent longs et droits (FIG :4.10,iv).

L'endoA2 semble utiliser une déformation déjà existante sur la membrane, à travers les tubules de Shiga, pour modifier leur aspect. Si l'endoA2 est présente avant StxB, il n'y a aucun tube ni tubule de Shiga. La topologie inverse, avec l'endoA2 encapsulée et StxB dans la solution extérieure ne permet pas de suivre cette chronologie. Afin de s'assurer de la nécessité de pré-déformation de la membrane nous avons utilisé une StxB-fluorescente (FIG :4.11). Nous avons alors pu mettre en évidence la présence de la toxine au sein des tubes devenus droits par l'action de l'endoA2.

On résume dans la FIG :4.12, le nombre de cas étudiés. La présence des tubes stabilisés et droits nécessite dans un premier temps la présence de la toxine de Shiga et de l'ajout dans un deuxième temps de l'endoA2. L'augmentation de la concentration en endoA2 tend même à augmenter la quantité de liposomes présentant des tubes droits.

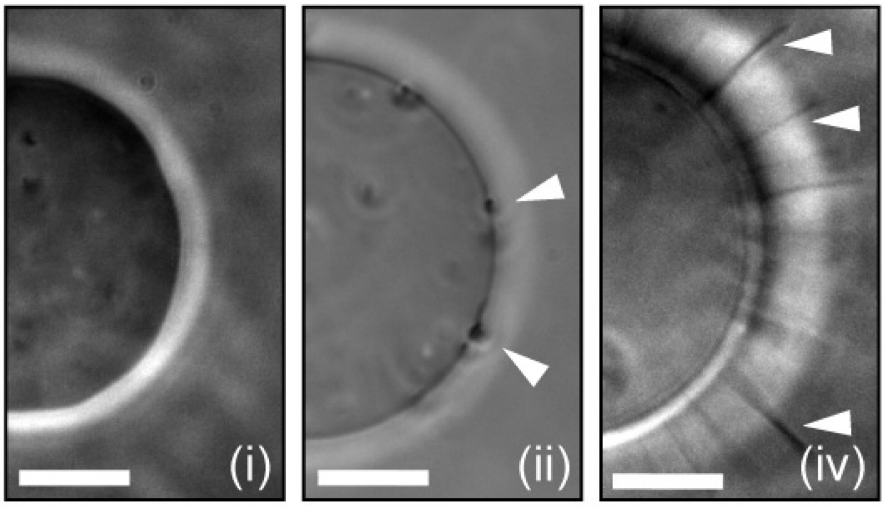


FIGURE 4.10 – Image en contraste de phase de liposomes. i) 4 µM d'endoA2 dans la solution externe. On ne note aucune présence de déformation sur la membrane ii) 40 µg/mL de StxB encapsulée, formant des tubules vers l'extérieur. iv) 40 µg/mL de StxB encapsulée et 4 µM d'endoA2 dans la solution externe. La morphologie des tubes est complètement modifiée par la présence de l'endoA2. Barre d'échelle 10 µm.

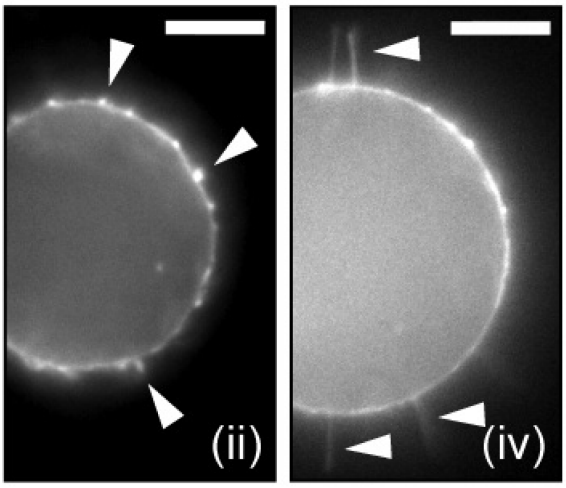


FIGURE 4.11 – Image en épifluorescence de liposome contenant 40 µg/mL de StxB fluorescente. ii) La présence de la toxine induit les tubules. iv) L'ajout de 4 µM d'endoA2 dans la solution extérieure forme des tubes dont l'intérieur est recouvert de fluorescence. Barre d'échelle 10 µm.

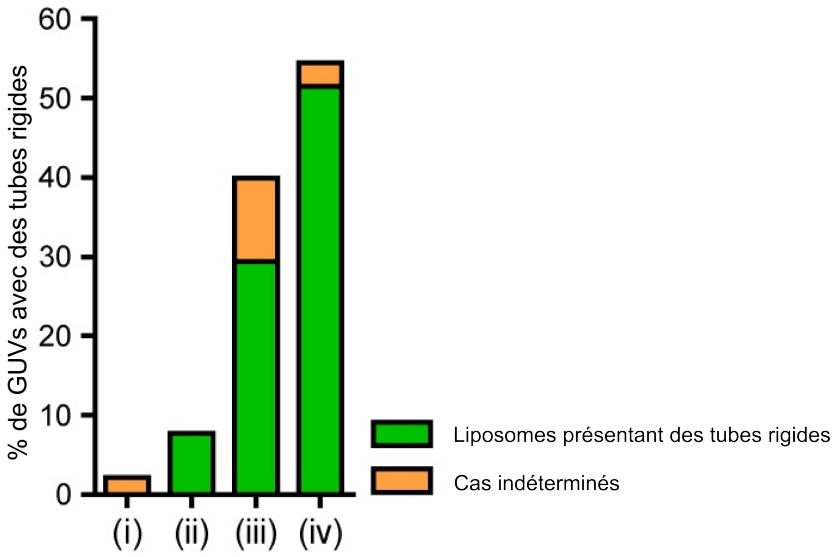


FIGURE 4.12 – Histogramme des résultats obtenus en fonction des concentrations en protéine endoA2, sans toxine de Shiga i) ou avec la toxine encapsulée ii) iii) iv). i) n=46, la présence seule de l'endoA2 n'induit aucun tube. ii) n=39, la présence de la toxine de Shiga peut induire, en plus des tubules, quelques tubes rigides (∼7%). iii) n=17, l'ajout de 2 µM d'endoA2 permet de faire apparaître des tubes rigides sur ∼26% des liposomes. iv) n=32, l'augmentation de la concentration en endoA2, à 4 µM augmente significativement le nombre de liposomes présentant des tubes rigides (∼50%). En jaune sont indiqués les pourcentages de cas indéterminés.

4.4 Conclusion

L'utilisation d'un système simplifié de membrane plasmique nous a permis de mieux cerner le rôle de l'endoA2 lors de phénomènes d'endocytose indépendants de la clathrine. La technique de l'émulsion inverse montre ici tous ses avantages puisqu'elle permet de reproduire, de chaque côté d'une membrane modèle, une interaction spécifique avec StxB d'un côté et l'endoA2 de l'autre côté. Nous avons ainsi montré que l'endoA2 seule ne peut pas induire de déformation membranaire mais elle est capable de changer la morphologie des tubules initiés par StxB. Par ailleurs, de par le changement de forme qu'elle induit, de longs tubes d'environ 10 µm très droits, on peut en déduire qu'elle est capable de stabiliser les déformations ce que l'on appelle l'effet "scaffolding". D'autres expériences effectuées par le groupe "Membranes et fonctions cellulaires" et présentées dans l'article montrent une scission sous force en présence d'endoA2. Aucun événement de scission membranaire n'est observé dans nos conditions biochimiques et sous force nulle. Pour qu'une scission du tube de membrane ait lieu il est nécessaire d'ajouter d'autres composants pour tirer à nouveau sur le tube tels que des moteurs moléculaires. Par ailleurs, le domaine SH3 présent en C-terminal de l'endoA2 est connu pour interagir avec les activateurs de polymérisation de l'actine tel que N-WASP. Il serait intéressant de regarder l'effet de la polymérisation de l'actine sur ces structures stabilisées par l'endoA2 sur notre système minimaliste.

4.5 Article 2 : Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis

Henri-François Renard*, Mijo Simunovic*, Joël Lemière*, Emmanuel Boucrot, Maria-Daniela Garcia-Castillo, Senthil Arumugam, Valérie Chambon, Christophe Lamaze, Christian Wunder, Anne K. Kenworthy, Anne A. Schmidt, Harvey T. McMahon, Cécile Sykes†, Patricia Bassereau†, Ludger Johannes.

*,† : égale contribution.

Article accepté à Nature LETTER
doi :10.1038 / nature14064

doi:10.1038/nature14064

1 3 Endophilin-A2 functions in membrane scission in clathrin-independent endocytosis

Henri-François Renard[1,2,3]*, Mijo Simunovic[4,5]*, Joël Lemière[6,7]*, Emmanuel Boucrot[8], Maria-Daniela Garcia-Castillo[1,2,3], Senthil Arumugam[1,2,3], Valérie Chambon[1,2,3], Christophe Lamaze[2,3,9], Christian Wunder[1,2,3], Anne K. Kenworthy[10], Anne A. Schmidt[11], Harvey T. McMahon[12], Cécile Sykes[6]*, Patricia Bassereau[4]* & Ludger Johannes[1,2,3]

During endocytosis, energy is invested to narrow the necks of cargo-containing plasma membrane invaginations to radii at which the opposing segments spontaneously coalesce, thereby leading to the detachment by scission of endocytic uptake carriers[1]. In the clathrin pathway, dynamin uses mechanical energy from GTP hydrolysis to this effect[2–4], assisted by the BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing protein endophilin[5,6]. Clathrin-independent endocytic events are often less reliant on dynamin[7], and whether in these cases BAR domain proteins such as endophilin contribute to scission has remained unexplored. Here we show, in human and other mammalian cell lines, that endophilin-A2 (endoA2) specifically and functionally associates with very early uptake structures that are induced by the bacterial Shiga and cholera toxins, which are both clathrin-independent endocytic cargoes[8]. In controlled *in vitro* systems, endoA2 reshapes membranes before scission. Furthermore, we demonstrate that endoA2, dynamin and actin contribute in parallel to the scission of Shiga-toxin-induced tubules. Our results establish a novel function of endoA2 in clathrin-independent endocytosis. They document that distinct scission factors operate in an additive manner, and predict that specificity within a given uptake process arises from defined combinations of universal modules. Our findings highlight a previously unnoticed link between membrane scaffolding by endoA2 and pulling-force-driven dynamic scission.

Shiga toxin induces the clathrin-independent formation of endocytic plasma membrane invaginations as a first step in its entry into cells[8]. How this highly bent membrane domain is recognized by cellular machinery has remained unexplored. Here we screened an expression library of curvature-recognizing BAR domain proteins[9] for their localization to these structures. The screen was performed using the receptor-binding B-subunit of Shiga toxin (STxB) on cells with decreased levels of ATP to perturb active cellular machinery that is involved in the processing of these endocytic structures[8,10]. Out of 17 different BAR proteins, only Toca-1, Toca-3 and amphiphysin-2 scored positively (Extended Data Fig. 1a, yellow underlay). However, their short interfering RNA (siRNA)-mediated depletion did not affect STxB trafficking, hence these proteins were not studied further. In cells that expressed exogenous endoA2 (Extended Data Fig. 1a, green underlay), STxB-induced tubules were much shorter (Extended Data Fig. 1b), suggesting a functional crosstalk between endoA2 and the STxB uptake process. Because in non-ATP-depleted cells STxB trafficking to the Golgi was not detectably altered by expression of green fluorescent protein (GFP)-tagged endoA2 (Extended Data Fig. 1c), short tubules were probably the consequence of scission of longer tubules, rather than the inhibition of tubule formation.

At the plasma membrane and in very early uptake structures, STxB colocalized with endogenous endoA2 (Fig. 1a, b) or GFP–endoA2 (Fig. 1c, Extended Data Fig. 2a and Supplementary Video 1). Similar colocalization with endogenous endoA2 was observed for the GM1 glycosphingolipid-binding B-subunit of cholera toxin (CTxB) (Fig. 1a), which shares with STxB many aspects related to endocytic membrane bending[11]. Furthermore, the lifetime of structures containing endoA2 strongly increased in the presence of STxB (Extended Data Fig. 2b), and endoA2 was recruited

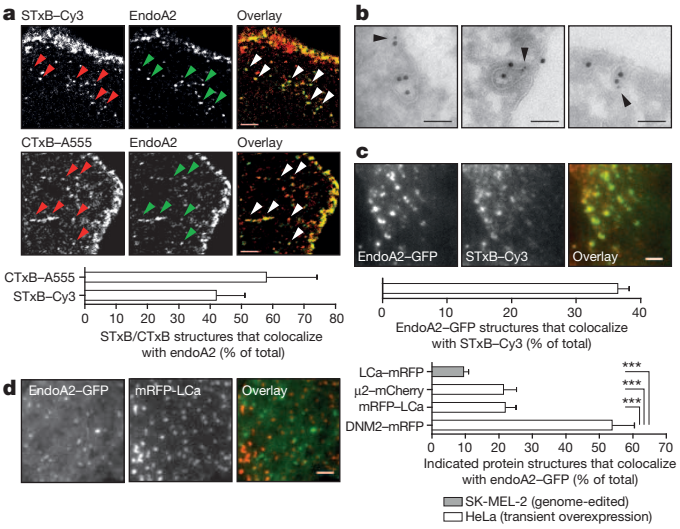


Figure 1 | EndoA2 localization to endocytic pathways. All conditions: incubation for 5 min at 37 °C (unless stated otherwise). **a**, BSC-1 cells with 50 nM STxB–Cy3 ($n = 20$ cells) or 5 nM CTxB-Alexa555 (A55) ($n = 50$ cells) for 3 min at 37 °C, and labelling for endoA2 (three independent experiments). **b**, Cryo-electron microscopy (representative of 50 images) on HeLa cells incubated with 0.5 μM STxB. Immunogold labelling: STxB, 15 nm gold particles; endoA2, 10 nm gold particles (arrowheads). **c**, HeLa cells transiently expressing endoA2–GFP incubated with 0.5 μM STxB–Cy3 and analysed by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) ($n = 25$ cells, three independent experiments). **d**, Colocalization analysis by TIRFM of endoA2 with the indicated markers. Transient expression in HeLa cells: red fluorescent protein (RFP)-tagged dynamin-2 (DNM2–mRFP), $n = 10$; mRFP-tagged clathrin light chain (mRFP–LCa), $n = 8$; μ2–mCherry, $n = 12$. Genome-edited SK-MEL-2 cells: LCa–mRFP, $n = 8$. Two independent experiments. ***$P < 0.001$ (Bonferroni's multiple comparison test). Scale bars, 2 μm (**a**, **c**, **d**) and 100 nm (**b**). Data are mean ± s.e.m.

[1]Institut Curie — Centre de Recherche, Endocytic Trafficking and Therapeutic Delivery group, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. [2]CNRS UMR3666, 75005 Paris, France. [3]U1143 INSERM, 75005 Paris, France. [4]Institut Curie — Centre de Recherche, Membrane and Cell Functions group, CNRS UMR 168, Physico-Chimie Curie, Université Pierre et Marie Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. [5]The University of Chicago, Department of Chemistry, 5735 S Ellis Ave, Chicago, Illinois 60637, USA. [6]Institut Curie — Centre de Recherche, Biomimetism of Cell Movement group, CNRS UMR 168, Physico-Chimie Curie, Université Pierre et Marie Curie, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. [7]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75205 Paris, France. [8]Institute of Structural and Molecular Biology, University College London & Birkbeck College, London WC1E 6BT, UK. [9]Institut Curie — Centre de Recherche, Membrane Dynamics and Mechanics of Intracellular Signaling group, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. [10]Vanderbilt School of Medicine, Department of Molecular Physiology and Biophysics, 718 Light Hall, Nashville, Tennessee 37232, USA. [11]CNRS, UMR7592, Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 15 rue Hélène Brion, 75205 Paris Cedex 13, France. [12]Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge Biomedical Campus, Francis Crick Avenue, Cambridge CB2 0QH, UK.
*These authors contributed equally to this work.

by STxB to the plasma membrane (Extended Data Fig. 2c and Supplementary Video 2). These results demonstrated that endoA2 localized to sites of STxB and CTxB internalization.

Endophilins have classically been associated with the clathrin pathway (for example, see ref. 12), even if recent studies have indicated that this view may need to be broadened[13,14]. Notably, the overlap of endoA2 with fluorescent-protein-tagged clathrin or the μ2 subunit of the clathrin adaptor AP2 was weak, both in transiently transfected HeLa cells, or genome-edited SK-MEL-2 cells (Fig. 1d and Extended Data Fig. 2d, e). STxB also only weakly colabelled with clathrin pathway markers in both cell systems (Extended Data Fig. 2g–j). By contrast, endoA2 extensively codistributed with dynamin (Fig. 1d and Extended Data Fig. 2f), as expected[5,6].

In endoA2-depleted cells, short and apparently tubular STxB-containing invaginations were observed with sizes at the resolution limit of confocal light microscopy (Extended Data Fig. 3a). Using a nanogold conjugate of STxB that was specifically developed for this study (Extended Data Fig. 3b, c), it could be shown by electron microscopy that these structures were connected to the plasma membrane (Fig. 2a and Extended Data Fig. 3d). Their frequency did not increase after depletion of endoA2 (Fig. 2b, left), whereas their average length significantly increased (Fig. 2b, right). These findings were strongly in favour of a function for endoA2 in scission of STxB-induced endocytic plasma membrane invaginations.

Retrograde STxB trafficking to the *trans*-Golgi network (TGN) in endoA2-depleted cells was quantified using a STxB variant with tandem protein sulfation sites, termed STxB-Sulf$_2$. With different siRNAs that had variable depletion efficiencies (Extended Data Fig. 4a), we found that sulfation of STxB-Sulf$_2$ in TGN membranes was inhibited in a dose-dependent manner with cellular endoA2 levels (Fig. 2c), while STxB cell-surface binding was not decreased (Extended Data Fig. 4b). Depletion of the TGN-localized tSNARE protein syntaxin-16 served as a benchmark treatment[15]. We concluded that endoA2 was required for efficient STxB trafficking into cells. A similar conclusion was reached when CTxB endocytosis was analysed in endoA2-depleted BSC-1 cells (Extended Data Fig. 4c).

In endoA2-depleted cells, the inhibition of STxB transport to Golgi membranes could also be documented by immunofluorescence (Fig. 2d). Expression of siRNA-resistant endoA2 or a SH3 domain deletion mutant (ΔSH3) rescued this phenotype (Fig. 2d and Extended Data Fig. 4d), suggesting that the function of endoA2 in STxB trafficking was independent of SH3 domain interaction with binding partners such as dynamin. By contrast, an amino-terminal amphipathic helix deletion mutant (endoA2ΔH0) failed to rescue STxB trafficking (Fig. 2d and Extended Data Fig. 4d), probably owing to a role of this helix in membrane recruitment (see below). Correspondingly, endoA2ΔSH3 expression reduced STxB-induced tubule length on ATP-depleted cells, similar to wild-type endoA2, whereas endoA2ΔH0 failed to do so (Extended Data Fig. 4e), reinforcing the hypothesis of endoA2 participating in membrane scission.

Depletion of endoA2 did not affect transferrin internalization or recycling, the steady-state localization of the clathrin cargo proteins TGN46 and cation-independent mannose 6-phophate receptor (CI-MPR)[16,17], or anterograde transport of E-cadherin (Extended Data Fig. 5a–c). Clearly, it was the cellular entry of STxB and CTxB that was specifically altered under these conditions. By contrast, depletion of the μ2 chain of AP2 had no effect on STxB trafficking, while transferrin uptake was efficiently blocked (Extended Data Fig. 5d–f).

To address the function of endoA2 in scission, we exploited the knocksideways system[18] to remove endoA2 acutely and reversibly from its normal site of action at the plasma membrane. HeLaM cells were used that expressed (1) the mitochondrial trap construct Mito-YFP-FRB (containing a yeast mitochondrial membrane protein, the yellow fluorescent protein (YFP) reporter and the FKBP-rapamycin-binding (FRB) domain), and (2) endoA2 tagged with both GFP and the rapamycin-binding protein FKBP. In cells with reduced ATP levels, the length of STxB-induced tubules was only slightly increased after depletion of endogenous endoA2 (Fig. 3a and Extended Data Fig. 6a), owing to the presence of the siRNA-resistant FKBP-tagged endoA2 fusion protein. The fusion protein was then sequestered on mitochondria by the addition of rapamycin, after which the length of STxB-containing tubules

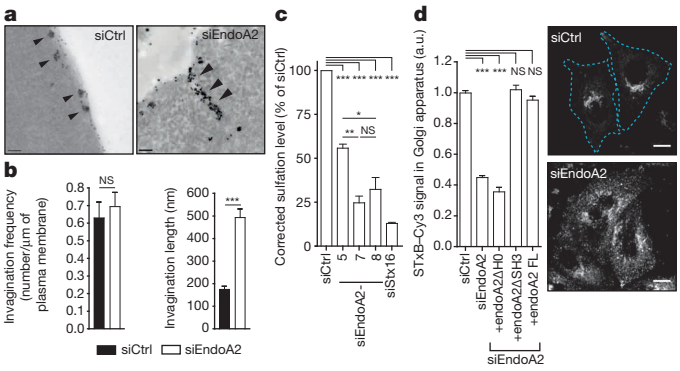


Figure 2 | EndoA2 functions in Shiga toxin uptake. **a**, Incubation for 5 min at 37 °C of control siRNA (siCtrl) or endoA2-depleted (siEndoA2) HeLa cells with nanogold-coupled STxB (arrowheads indicate invaginations; representative images of numbers of cells as shown in **b**). **b**, Frequency (siCtrl, $n = 25$ cells; siEndoA2, $n = 27$ cells) and length (siCtrl, $n = 149$ tubules; siEndoA2, $n = 138$ tubules) of STxB-containing invaginations on experiments as in **a**. NS, non significant. $***P < 0.001$ (two-tailed Mann–Whitney U test). **c**, Sulfation analysis ($n = 3$ independent experiments) on HeLa cells, using siRNAs targeting endoA2 (siEndoA2-5, 7 and 8), syntaxin-16 (siStx16) or control siRNA. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ (Bonferroni's multiple comparison test). **d**, Rescue experiment on endoA2-depleted HeLa cells. Incubation for 45 min at 37 °C with 50 nM STxB–Cy3. One arbitrary unit (a.u.) corresponds to 78.7 ± 1.2% of STxB in Golgi area. Numbers of cells: siCtrl, $n = 145$; siEndoA2, $n = 190$; siEndoA2 plus endoA2ΔH0, $n = 46$; siEndoA2 plus endoA2 lacking the C-terminal SH3 domain (endoA2ΔSH), $n = 31$; siEndoA2 plus full-length (FL) endoA2, $n = 56$; two independent experiments. $***P < 0.001$ (Bonferroni's multiple comparison test). Scale bars, 100 nm (**a**) and 10 μm (**d**). Data are mean ± s.e.m.

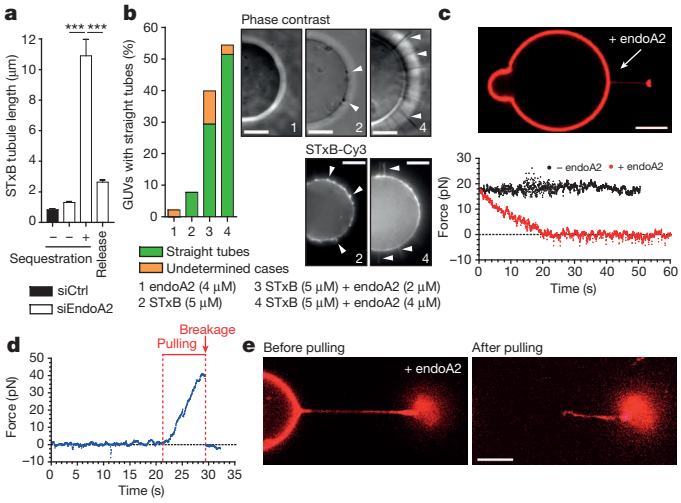


Figure 3 | Model membrane experiments. **a**, Knocksideways technique on ATP-depleted HeLaM cells in control (siCtrl) or endoA2-depletion (siEndoA2) conditions. Incubations for 15 min at 37 °C with 0.5 μM STxB. Mean ± s.e.m. of the following numbers of tubules: siCtrl, $n = 65$ (30 cells); without (−) sequestration, $n = 101$ (52 cells); with (+) sequestration, $n = 313$ (131 cells); release, $n = 626$ (187 cells); two independent experiments. $***P < 0.001$ (Dunn's multiple comparison test). **b**, Inverse emulsion technique in conditions 1–4, as indicated. Number of vesicles: 1, $n = 46$; 2, $n = 39$; 3, $n = 17$; 4, $n = 32$; three independent experiments. Arrows point to tubular structures. **c**–**e**, Nanotube tethers. **c**, Tube retraction force in presence (1 μM) or absence of endoA2. Representative of 21 experiments. **d**, **e**, Measurement of retraction force over time upon stepwise elongation at 0.5 μm s^{-1} of an endoA2-scaffolded tube (**d**), and pulling-force-driven scission (**e**). Scale bars, 10 μm (**b**) and 5 μm (**c**, **e**).

Nature nature14064.3d 3/12/14 08:17:05

significantly increased (Fig. 3a and Extended Data Fig. 6a). This effect was reversible, as rapamycin washout led to significantly shorter tubules (release condition). These results strongly reinforced the idea that endoA2 is involved in the scission of STxB-induced endocytic invaginations.

Controlled model membrane systems were then used to dissect aspects of endoA2 function with respect to membrane tubulation and scission. Cell-sized liposomes that reproduced a key aspect of natural membranes, that is, an asymmetric bilayer composition, were obtained via the inverse emulsion technique[19] (see Methods for leaflet compositions). To permit the acute introduction of endoA2 into the system, its topology was inverted with respect to the cellular situation: when indicated, STxB was included inside liposomes, whereas endoA2 was added to the external medium. Incubation with up to 4 μM endoA2 did not lead to the formation of tubules (Fig. 3b, condition 1). By contrast, liposomes that contained STxB exhibited coiled tubular protrusions (condition 2). Addition of endoA2 to STxB-containing liposomes at concentrations of 2 or 4 μM (Fig. 3b, conditions 3 or 4, respectively) caused tube straightening. Thus, endoA2 prompted the morphological transformation of STxB-induced tubular membranes.

For dynamic measurements, we turned to another setup in which optical tweezers were used to pull membrane tethers mechanically from giant unilamellar vesicles, held with a micropipette[20]. The force exerted by protein binding onto the tether membrane could be directly measured, tube radii controlled in a range from 10 to 100 nm, and tube elongation driven at controlled velocities. After endoA2 injection at concentrations as low as 1 μM (protein concentration inside the injection pipette), the tube retraction force decreased to zero (Fig. 3c), indicating the formation of an external scaffold on the tether membrane, which probably explained the morphological transformation in the asymmetric bilayer system.

We did not observe spontaneous scission of endoA2-scaffolded tubes ($n = 35$). However, when these were pulled further at elongation rates of $\sim$0.5 μm s^{-1}, the tube retraction force increased (Fig. 3d), leading to breakage in 15 out of 18 cases (Fig. 3e). Elongation of bare tethers from fluid membranes, at rates as those used in this study, never leads to scission[19,21], and we explicitly confirmed the resilience of bare tubes on forced elongation at an increased rate of $\sim$10 μm s^{-1} ($n = 2$). We speculate that interactions between endoA2 scaffold and underlying lipids limit the flow of lipids during tube extension, thereby leading to increased membrane tension and spontaneous squeezing of the tube until the scission threshold radius has been reached.

The pulling speed that was required *in vitro* to induce the scission of endoA2-scaffolded tubes was very similar to the speed produced by microtubule-based molecular motors[22], and microtubules have previously been implicated in the cellular entry of Shiga toxin[23]. Interference with microtubule-based functions before reduction of cellular ATP levels led to the loss of micrometre-long STxB-induced tubules (Extended Data Fig. 6b, c), while short (<200 nm) tubules persisted (Extended Data Fig. 7). These findings suggested that STxB-induced invaginations were recognized by molecular motors for the further processing into cells.

As indicated by a change in tube retraction force, the endoA2ΔH0 mutant formed a scaffold only at concentrations above 7 μM (Extended Data Fig. 6d), seven times higher than the minimum concentration required for wild-type endoA2. Furthermore, the radius of the endoA2H0 scaffold was on average twice that of the wild-type endoA2 (23 ± 10 nm, mean ± s.d., $n = 10$, versus 12 ± 4 nm, $n = 6$, respectively). When pulled, endoA2ΔH0-scaffolded tubes nevertheless underwent scission in 5 out of 5 cases (Extended Data Fig. 6e). The N-terminal amphipathic helix thus did not have a decisive role in scission by elongation of scaffolded membrane tubes. Rather, it seemed important for efficient recruitment of endoA2 to the membrane, as well as possibly affecting the molecular organization of the scaffold.

We next investigated the role of endoA2 together with other scission factors that have been shown before to play a part in STxB uptake. The first was actin[10]. EndoA2 and actin strongly and dynamically colocalized (Extended Data Fig. 8a), and even in endoA2-depleted cells actin was localized on STxB-induced membrane invaginations (Extended Data Fig. 8b, c). This indicated that endoA2 was not required for actin recruitment to STxB uptake structures. Interestingly, the depletion of endoA2 or the depolymerization of actin with 0.5 μM latrunculin-A led to a similar increase in the length of STxB-induced tubules, and the concomitant treatment had an additive effect (Fig. 4a and Extended Data Fig. 8d, e). Thus, both endoA2 and actin contributed independently to scission probability in STxB endocytosis. In cells that were depleted of ARPC2 (p34 subunit of the Arp2/3 complex), the length of STxB-induced tubules was similar to that observed in latrunculin-A-treated cells (Fig. 4a and Extended Data Fig. 8f), confirming the specificity of our observations.

After depletion of dynamin, STxB-induced tubules were longer than in control cells[8] (Fig. 4a), and endoA2 was clearly localized on these structures (Extended Data Fig. 9a, bottom). Tubules positive for endogenous endoA2 (Extended Data Fig. 9b) were seen only in the presence of STxB (compare ±STxB panels), in line with our model membrane results. This finding documented that these tubules did not preexist but were indeed induced by STxB. Dynamin was still found in association with STxB uptake structures in endoA2-depleted cells (Extended Data Fig. 9c), indicating that in addition to endoA2, other proteins contribute to dynamin recruitment to membranes[24]. As for actin, concomitant depletion of dynamin and endoA2 had an additive effect on the length of STxB-induced tubules (Fig. 4a and Extended Data Fig. 9d).

Actin, dynamin and endoA2 thus independently contributed to the probability of scission in the STxB uptake pathway. Indeed, when dynamin and endoA2-depleted cells were concomitantly incubated with 0.25 μM latrunculin-A, tubule length increased further, leading to an unprecedented tubulation phenotype throughout the cell population (Fig. 4a and Extended Data Fig. 9d). Importantly, when STxB-induced tubules were binned according to their length (Fig. 4b), a frequency shift was observed when going from unperturbed cells (condition A, red) to cells submitted to single (condition B, yellow), double (condition E, green) or triple (condition H, blue) perturbation. This data representation clearly illustrated that short tubules (most abundant in unperturbed cells) were progressively transformed into long tubules (most abundant in the triple-perturbation condition).

Protein biosynthesis inhibition is an established measure of Shiga toxin arrival in the cytosol[25]. Cells that were depleted of endoA2 or dynamin, or incubated with 0.25 μM latrunculin-A, were only weakly protected against Shiga-like toxin-1 (STx-1; note that STx-1 and Shiga toxin differ by only one residue) (Fig. 4c and Extended Data Fig. 10a–c). These

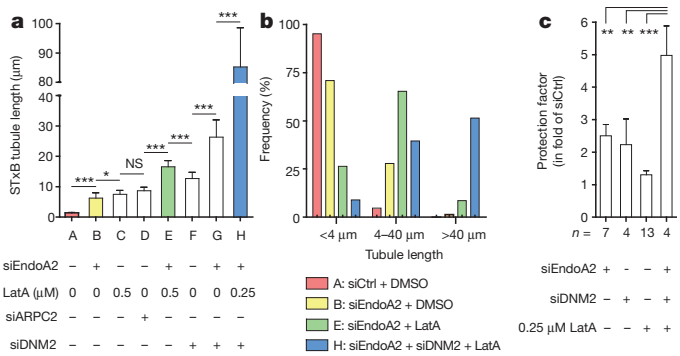


Figure 4 | Additive effects of scission factors. **a**, Incubation of HeLa cells for 5 min at 37 °C with 0.5 μM STxB–Cy3. Determination of tube length on fixed cells (number of tubules per condition: A, $n = 254$; B, $n = 79$; C, $n = 94$; D, $n = 146$; E, $n = 118$; F, $n = 338$; G, $n = 131$; H, $n = 115$); two independent experiments. NS, non significant, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ (Dunn's multiple comparison test). LatA, latrunculin-A. **b**, Frequency distribution of tubules according to length (conditions as in **a**). **c**, Intoxication analysis. Protection factors on 4–13 independent experiments per condition. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ (Bonferroni's multiple comparison test). Data are mean ± s.e.m.

individual treatments thus failed to impose a transport block that would shut down access to the cytosol to levels that were required to be robustly detected by this extremely sensitive method. By contrast, triple treatment induced a substantial shift to the right of the intoxication curves (Extended Data Fig. 10d), such that 5.0-fold (± 0.9, $n = 4$) more STx-1 was required to achieve the same level of protein biosynthesis inhibition as in control conditions (see quantification in Fig. 4c). Clearly, the scission factors endoA2, actin and dynamin needed to be inhibited simultaneously for a substantial protection of cells against STx-1.

Our study reveals a novel function of endoA2 in clathrin-independent endocytosis of Shiga and cholera toxin, and suggests more generally that this BAR domain protein operates preferentially on non-clathrin sites of uptake (see ref. 26). Our data also provide strong evidence for a function of endoA2 in the scission process. In the context of the Shiga toxin model, endoA2 is, to our knowledge, the first cellular factor that was identified to recognize specifically the mechanical signal transmitted by the toxin to the cytosol: a highly curved plasma membrane domain. Unexpectedly, our findings suggest that actin[10] and dynamin[8] contribute in an additive manner with endoA2 to scission in Shiga toxin uptake. They probably act on the same endocytic invaginations and not on parallel uptake events, since the overall length of Shiga-toxin-induced plasma membrane tubules strongly increased in cells in which all three scission factors were inhibited. Such additive function in scission is unexpected and suggests that specificity within given endocytic processes is the result of defined cocktails of modular machinery. This hypothesis does not exclude a functional interaction between scission factors[27,28]. An exciting new modality emerges from our observations that scaffolding by endoA2 sensitizes tether membranes for pulling-force-induced scission. This finding should stimulate further research into the function of cytoskeleton-based molecular motors in scission and the mechanisms by which scaffolding by BAR domain proteins prime membranes to this effect.

Online Content Methods, along with any additional Extended Data display items and Source Data, are available in the online version of the paper; references unique to these sections appear only in the online paper.

Received 15 August; accepted 14 November 2014.
Published online 17 December 2014.

1. Campelo, F. & Malhotra, V. Membrane fission: the biogenesis of transport carriers. *Annu. Rev. Biochem.* **81,** 407–427 (2012).
2. Shnyrova, A. V. *et al.* Geometric catalysis of membrane fission driven by flexible dynamin rings. *Science* **339,** 1433–1436 (2013).
3. Morlot, S. *et al.* Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell* **151,** 619–629 (2012).
4. Faelber, K. *et al.* Crystal structure of nucleotide-free dynamin. *Nature* **477,** 556–560 (2011).
5. Sundborger, A. *et al.* An endophilin-dynamin complex promotes budding of clathrin-coated vesicles during synaptic vesicle recycling. *J. Cell Sci.* **124,** 133–143 (2011).
6. Neumann, S. & Schmid, S. L. Dual role of BAR domain-containing proteins in regulating vesicle release catalyzed by the GTPase, dynamin-2. *J. Biol. Chem.* **288,** 25119–25128 (2013).
7. Howes, M. T., Mayor, S. & Parton, R. G. Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22,** 519–527 (2010).
8. Römer, W. *et al.* Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* **450,** 670–675 (2007).
9. Mim, C. & Unger, V. M. Membrane curvature and its generation by BAR proteins. *Trends Biochem. Sci.* **37,** 526–533 (2012).
10. Römer, W. *et al.* Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis. *Cell* **140,** 540–553 (2010).
11. Ewers, H. *et al.* GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nature Cell Biol.* **12,** 11–18 (2010).
12. Milosevic, I. *et al.* Recruitment of endophilin to clathrin-coated pit necks is required for efficient vesicle uncoating after fission. *Neuron* **72,** 587–601 (2011).
13. Llobet, A. *et al.* Endophilin drives the fast mode of vesicle retrieval in a ribbon synapse. *J. Neurosci.* **31,** 8512–8519 (2011).
14. Kononenko, N. L. *et al.* Clathrin/AP-2 mediate synaptic vesicle reformation from endosome-like vacuoles but are not essential for membrane retrieval at central synapses. *Neuron* **82,** 981–988 (2014).
15. Amessou, M. *et al.* Syntaxin 16 and syntaxin 5 control retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J. Cell Sci.* **120,** 1457–1468 (2007).
16. Draper, R. K., Goda, Y., Brodsky, F. M. & Pfeffer, S. R. Antibodies to clathrin inhibit endocytosis but not recycling to the *trans* Golgi network *in vitro*. *Science* **248,** 1539–1541 (1990).
17. Nesterov, A., Carter, R. E., Sorkina, T., Gill, G. N. & Sorkin, A. Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant μ2 subunit and its effects on endocytosis. *EMBO J.* **18,** 2489–2499 (1999).
18. Robinson, M. S., Sahlender, D. A. & Foster, S. D. Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Dev. Cell* **18,** 324–331 (2010).
19. Campillo, C. *et al.* Unexpected membrane dynamics unveiled by membrane nanotube extrusion. *Biophys. J.* **104,** 1248–1256 (2013).
20. Cuvelier, D., Derenyi, I., Bassereau, P. & Nassoy, P. Coalescence of membrane tethers: experiments, theory, and applications. *Biophys. J.* **88,** 2714–2726 (2005).
21. Evans, E. & Yeung, A. Hidden dynamics in rapid changes of bilayer shape. *Chem. Phys. Lipids* **73,** 39–56 (1994).
22. Toba, S., Watanabe, T. M., Yamaguchi-Okimoto, L., Toyoshima, Y. Y. & Higuchi, H. Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103,** 5741–5745 (2006).
23. Hehnly, H., Sheff, D. & Stamnes, M. Shiga toxin facilitates its retrograde transport by modifying microtubule dynamics. *Mol. Biol. Cell* **17,** 4379–4389 (2006).
24. Meinecke, M. *et al.* Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *J. Biol. Chem.* **288,** 6651–6661 (2013).
25. Johannes, L. & Römer, W. Shiga toxins - from cell biology to biomedical applications. *Nature Rev. Microbiol.* **8,** 105–116 (2010).
26. Boucrot, E. *et al.* Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature* http://dx.doi.org/10.1038/nature14067 (this issue).
27. Itoh, T. *et al.* Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev. Cell* **9,** 791–804 (2005).
28. Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A. & De Camilli, P. GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* **441,** 528–531 (2006).

Supplementary Information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements We would like to acknowledge the following people for help in experiments and providing materials or expertise: A. Berthier, L. Cabanié, K. Carvalho, P. de Camilli, C. Day, D. Drubin, A. El Marjou, V. Fraisier, A. Gautreau, T. Kirchhausen, L. Leconte, C. Merrifield, G. Montagnac, P. Paul-Gilloteaux, M. S. Robinson, L. Sengmanivong and E. Smythe. The facilities as well as scientific and technical assistance from staff in the PICT-IBiSA/Nikon Imaging Centre at Institut Curie-CNRS and the France-BioImaging infrastructure (ANR-10-INSB-04) are acknowledged. This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-BLAN-283 to L.J. and C.S., ANR-10-LBX-0038 to C.L., ANR-11 BSV2 014 03 to L.J. and P.B., ANR-12-BSV5-0014 to C.S.), the Indo-French Centre for the Promotion of Advanced Science (project no. 3803, L.J.), Marie Curie Actions — Networks for Initial Training (FP7-PEOPLE-2010-ITN, L.J.), European Research Council advanced grant (project 340485, L.J.), Marie Curie International Reintegration Grant (FP7-RG-277078, C.W.), the Royal Society (RG120481, E.B.), Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (DEQ20120323737, C.S.), National Institutes of Health (RO1 GM106720, A.K.K.), La Ligue contre le Cancer, Comité de Paris (RS08/75-89, A.A.S.), and by fellowships from Association pour la Recherche sur le Cancer (H.-F.R., J.L. and M.-D.G.-C.), AXA Research Funds (J.L. and M.-D.G.-C.), the Biological Sciences Research Council (David Phillips Research Fellowship to E.B.), Chateaubriand fellowship and the France and Chicago Collaboration in the Sciences grant (M.S.). The Johannes, Lamaze, Sykes and Bassereau teams are members of Labex CelTisPhyBio (11-LBX-0038) and of Idex Paris Sciences et Lettres (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL). P.B.'s group belongs to the French research consortium CellTiss.

Author Contributions The following datasets were contributed by the indicated authors: Figs 1b–d, 2–4 and Extended Data Figs 1–3, 4a, b, d, e, 5–10 (H.-F.R.); Fig. 3c–e and Extended Data Fig. 6d, e (M.S.); Fig. 3b (J.L.); Fig. 1a and Extended Data Fig. 4c (E.B.); Fig. 4c and Extended Data Fig. 10 (M.-D.G.-C.); Fig. 2a and Extended Data Fig. 3d (S.A. and V.C.); Fig. 1b and Extended Data Figs 3b, c and 7 (V.C.). C.L., C.W., A.K.K., A.A.S. and H.T.M. provided technical support and conceptual advice. C.S., P.B. and L.J. provided direction and guidance. L.J. conceived the initial design of the study and wrote the first draft. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.J. (ludger.johannes@curie.fr).

Nature nature14064.3d 3/12/14 08:17:10

METHODS

Antibodies and other reagents. The following antibodies were purchased from the indicated suppliers: rabbit polyclonal anti-endoA2 for western blotting (Bethyl, A302-349A, 1:2,000) or immunofluorescence and cryo-electron microscopy (Santa Cruz Biotechnology, sc-25495, 1:200 for immunofluorescence and 1:10 for cryo-electron microscopy); rabbit polyclonal anti-STxB (Covalab, 1:100 for cryo-electron microscopy); mouse monoclonal anti-clathrin heavy chain for western blotting (BD Biosciences, 610500, 1:5,000); mouse monoclonal anti-α-tubulin (Sigma, T5168, 1:5,000 for western blotting); rabbit polyclonal anti-syntaxin-16 (Synaptic Systems, 110 163, 1:1,000 for western blotting); rabbit monoclonal anti-giantin (Institut Curie, recombinant proteins platform, A-R-R#05, 1:100 for immunofluorescence); sheep polyclonal anti-TGN46 (Serotec, AHP500G, 1:200 for immunofluorescence); mouse monoclonal anti-CI-MPR (Abcam, ab2733, 1:200 for immunofluorescence); rabbit polyclonal anti-mCherry (Institut Curie, Plateforme protéines recombinantes, A-P-R#13, 1:200 for immunofluorescence); mouse monoclonal anti-GFP (Roche Applied Sciences, 11 814 460 001, 1:1,000 for western blotting); mouse monoclonal anti-dynamin Hudy 1 (Upstate, 05-319, 1:200 for immunofluorescence); mouse monoclonal anti-dynamin (BD Biosciences, 610246, 1:1,000 for western blotting); rabbit polyclonal anti-ARPC2 (Millipore, 07-227, 1:1,000 for western blotting); rabbit polyclonal anti-DYNC1H1 (Proteintech, 12345-1-AP, 1:200 for western blotting); secondary antibodies conjugated to Alexa488, Cy3, Cy5, AMCA or horseradish peroxidase (HRP) (Beckman Coulter and Invitrogen). The mouse monoclonal anti-STxB antibody 13C4 was purified from hybridoma cells (ATCC CRL-1794), and the mouse monoclonal anti-clathrin heavy chain antibody X22 (used at 1:1,000 for immunofluorescence) was a gift from E. Smythe. 2-deoxy-D-glucose, sodium azide, latrunculin-A and nocodazole were purchased from Sigma.

Cell culture. HeLa and BSC-1 cells were grown at 37 °C under 5% CO_2 in DMEM high glucose glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% FCS, 0.01% penicillin-streptomycin and 5 mM pyruvate. Genome-edited SK-MEL-2 cells expressing mRFP–LCa were provided by D. Drubin, and grown at 37 °C under 5% CO_2 in DMEM/F12 (Invitrogen) supplemented with 10% FCS, 0.01% penicillin-streptomycin and 5 mM pyruvate. HeLaM cells stably expressing Mito-YFP-FRB were provided by M. S. Robinson. These were grown at 37 °C under 5% CO_2 in DMEM high glucose glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% FCS, 0.01% penicillin-streptomycin, 5 mM pyruvate and 137.5 μg ml^{-1} hygomycine B. HeLaM Mito-YFP-FRB cells stably expressing C-terminally GFP-FKBP-tagged rat endoA2 were generated for this study (see below) and grown in the same medium as the mother cells, supplemented with 0.5 mg ml^{-1} G418.

Depletion of cellular ATP. Cellular ATP was depleted as previously described[8,29]. In brief, cells were incubated for 15–20 min at 37 °C in PBS^{++} supplemented with 10 mM 2-deoxy-D-glucose and 10 mM NaN_3.

DNA constructs and transfection. Expression plasmids for C-terminally GFP-tagged rat endoA2 (P. De Camilli), mCherry-tagged μ2 subunit of AP2 (C. Merrifield), mRFP-tagged dynamin-2 or clathrin light chain (LCa) (T. Kirchhausen) were provided by the indicated colleagues.

A bicistronic vector encoding SBP-mCherry-E-cadherin and KDEL-streptavidin, used for the anterograde E-cadherin transport assay, was provided by F. Perez, and a plasmid encoding mCherry-LifeAct[30,31] by P. Chavrier.

GFP-tagged mutants of endoA2 (ΔH0 lacking N-terminal amphipatic H0 helix, and ΔSH3 lacking C-terminal SH3 domain) were obtained by PCR from full-length endoA2.

For knocksideways with endoA2, a C-terminally GFP-FKBP-tagged rat endoA2 construct was engineered. For this, rat endoA2–GFP and the FKBP sequence bearing a stop codon were amplified by PCR from plasmids (for amplification of endoA2-GFP fragment, forward primer was 5′-ATACTTAAGATGTCGGTGGCGGGGC TGAAG-3′ and reverse primer was 5′-TTCCACCTGCACTCCCATCCCTCCG CCCTTGTACAGCTCGTCCAT-3′; for amplification of FKBP fragment, forward primer was 5′-ATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGAGGGATGGGAGTGCA GGTGGAA-3′ and reverse primer was 5′-AGTGCGGCCGCTTATTCCAGTTT TAGAAGCTC-3′). The PCR fragments were designed in such a way that they possessed overlapping sequences. This allowed obtaining an endoA2–GFP–FKBP fragment via a third PCR on the two previous fragments with appropriate primers (forward primer from endoA2-GFP amplification: 5′-ATACTTAAGATGTCGG TGGCGGGGCTGAAG-3′; reverse primer from FKBP fragment amplification: 5′-AGTGCGGCCGCTTATTCCAGTTTTAGAAGCTC-3′). After insertion in a pIRESneo2 vector between AflII and NotI restriction sites, clones were validated by sequencing.

For immunofluorescence and live-cell imaging experiments, plasmids were transfected with FuGene 6 (Promega) according to the manufacturer's instructions, or using the classical calcium phosphate procedure[32]. Cells were used for experiments 16–24 h after transfection. For the production of a HeLaM Mito-YFP-FRB cell line stably expressing endoA2–GFP–FKBP, the pIRESneo2/endoA2–GFP–FKBP plasmid was transfected by electroporation, and clones were selected with 0.5 mg ml^{-1} G418.

RNA interference. Most siRNAs used in this study were purchased from Qiagen and transfected with HiPerFect (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Experiments were performed 72 h after siRNA transfection, where protein depletion efficiency was maximal as shown by immunoblotting analysis with specific antibodies (routinely 80–90%). For most experiments, cells were replated 24 h before use, according to the need of the experiment. AllStars Negative Control siRNA served as a reference point. The depletion of endoA2 was achieved with three different sequences at final concentrations between 2 and 10 nM: 5 (SI03057250: 5′-CACCAGCAAGGCGGTGACAGA-3′), 7 (SI03073931: 5′-CATGCTCAACA CGGTGTCCAA-3′) and 8 (SI03108049: 5′-TACACTAGCGCTGACTCCCAA-3′). For syntaxin-16 depletion, a custom-made siRNA sequence was used[15] at concentrations between 2 and 10 nM (5′-AAGCAGCGATTGGTGTGACAA-3′); for dynamin-2, a single siRNA at 10 nM (SI02654687: 5′-CTGCAGCTCATCTTCTC AAAA-3′); for α-adaptin, a single siRNA sequence[33] at concentrations between 10 and 40 nM (5′-AAATGGCGGTGGTGTCGGCTC-3′, Dharmacon); for ARPC2, a smartpool of 4 siRNA sequences (L-012081-00, Dharmacon: 5′-CCATGTATG TTGAGTCTAA-3′, 5′-GCTCTAAGGCCTATATTCA-3′, 5′-GGACAGAGTCA CAGTAGTC-3′ and 5′-GTACGGGAGTTTCTTGGTA-3′) at 40 nM.

For endoA2 depletion from BSC-1 cells, a single all Stealth siRNA was used (HSS109705, Invitrogen: 5′-GCTGACCAACCAGATCGATGAGAAC-3′). Cells seeded on 12 mm coverslips placed in 24-well plates (for microscopy) or on glass-bottom 96-well plates (plate-reader experiments) were transfected twice (on days 1 and 2) with oligofectamine (Life Technologies) complexed to 8 or 1.6 pmol, respectively, of HSS109705 siRNA and analysed on day 4 (72 h after the first transfection).

Recombinant proteins. Recombinant wild-type STxB, STxB-Cys and STxB-$Sulf_2$ were purified from bacterial periplasmic extracts as previously described[34]. C-terminally Strep-tagged mouse endoA2 and endoA2ΔH0 (N-terminal amphipatic helix deletion mutant) were expressed in bacteria and purified on a Strep-Tactin column (IBA), as previously described[35]. See Supplementary Information for more details.

Light microscopy. For immunofluorescence studies, cells were maintained at 37 °C during the full duration of the experiment and during fixation (4% paraformaldehyde) to preserve the integrity of STxB-induced tubules. After quenching with 50 mM NH_4Cl and permeabilization with saponin (0.5% saponin, 2% BSA in PBS), cells were incubated with primary and secondary antibodies, and mounted with Mowiol.

Fixed samples were imaged with a Nikon A1r confocal microscope equipped with a CFI Plan Apo VC 60× numerical aperture (NA) 1.4 oil immersion objective, when not specified otherwise. Wild field images were acquired on a Leica DM 6000B epifluorescence inverted microscope equipped with a HCX PL Apo 63× NA 1.40 oil immersion objective and an EMCCD camera (Photometrics CoolSNAP HQ). Super resolution images were acquired on a N-SIM (Structured Illumination Microscopy, Nikon) equipped with a CFI Apo TIRF 100× NA 1.49 oil immersion objective and an EMCCD camera (Photometrics CoolSNAP HQ2).

For live-cell imaging, cells were grown to subconfluence on FluoroDish chambers with integrated glass coverslips (World Precision Instruments). All observations were made at 37 °C and 5% CO_2. Different imaging devices were used. Plasma membrane images were acquired on a TIRF video microscope (Nikon) equipped with a CFI Apo TIRF 100× NA 1.49 oil objective and an EMCCD camera (Photometrics HQ2). Other live-cell images were acquired on spinning disk confocal devices (Nikon) equipped with EMCCD cameras (Photometrics CoolSNAP HQ2). Montages, kymographs and videos were prepared with ImageJ or Fiji (NIH) and MetaMorph Software.

BAR domain screening. After 24 h transfection of HeLa cells with fluorescent-protein-tagged constructs, cells were ATP-depleted for 20 min, incubated for 20 min with 1 μM STxB–Cy3 or STxB-Alexa488, fixed at 37 °C, mounted, and viewed by confocal microscopy. The initial phenotype that was scored was BAR domain protein localization on STxB-induced plasma membrane invaginations.

Electron microscopy. Two different cell embedding techniques were used: cryo-protection and epon. For further details, see Supplementary Information.

STxB sulfation. The sulfation assay was performed as previously described[36]. For further details, see Supplementary Information.

CTxB internalization. Alexa555-labelled CTxB (Life Technologies) was used at 0.9–5 nM (50–285 ng ml^{-1}) and incubated on cells directly at 37 °C and 5% CO_2 (without pre-incubation on ice) for up to 10 min. After incubation, samples destined for microscopy were quickly washed once and fixed at 37 °C with pre-warmed 3.7% paraformaldehyde (PFA) in PBS (20 min, 37 °C). Samples were then washed (twice with PBS and once with 50 mM NH_4Cl in PBS), immunostained and imaged on a laser-scanning confocal microscope (TCS Sp5 AOBS; Leica). For CTxB uptake assay, cells grown in 96-well glass bottom black plates (Thermo Scientific) were incubated with 5 nM toxin for 10 min at 37 °C, moved on ice to stop further endocytosis, washed once with ice-cold PBS to remove unbound toxin and twice with an ice-cold low pH solution (300 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0.2 M acetic acid, pH 2.5, as described previously[37,38]), which removed 90 ± 6% of

the cell surface signals ($n = 3$, $P < 0.0001$, two tailed t-test) as compared to samples incubated with the toxin on ice (surface staining). The samples were then further washed twice with ice-cold PBS (to increase the pH back to 7.4) and finally fixed on ice with 3.7% PFA for 30 min. Cells were then washed twice with PBS and once with 50 mM NH_4Cl in PBS and incubated with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to label their DNA (used to normalize the number of cells in between samples and experiments). Signals from internalized CTxB-Alexa555 (protected from the acid wash) and DAPI were measured using a plate reader (FLUOstar Optima, BMG).

Intoxication. The intoxication assay with STx-1 holotoxin was performed as previously described[39]. For further details, see Supplementary Information.

Knocksideways. The knocksideways technique was adapted to endoA2, as described[40]. For further details, see Supplementary Information.

Flow cytometry. siRNA transfected or PPMP-treated cells (as control) were detached using 4 mM EDTA and incubated for 30 min on ice with transferrin-Alexa647 (Tf-A647; 10 μg ml^{-1}) and STxB-cysteine-Alexa488 (1 μM) in PBS^{++} containing 0.2% BSA. After washing in ice-cold PBS, fluorescence was measured with a LSR-II flow cytometer (BD Biosciences). Single-stained samples were used to verify that the fluorescence from each fluorophore was only detected in the expected channel.

Transferrin endocytosis. The endocytosis assay was performed essentially as previously described[36]. For further details, see Supplementary Information.

Transferrin recycling. Cells were incubated for 40 min at 37 °C with biotinylated transferrin with a disulfide bond (Tf-SS-biot; 60 μg ml^{-1}) in PBS^{++} supplemented with 5 mM glucose and 0.2% BSA. After washing, cells were aliquoted (150,000 cells per data point) and placed for the indicated times at 37 °C in PBS^{++} supplemented with 5 mM glucose and 0.2% BSA in the presence of a 50-fold molar excess of non-biotinylated holo-Tf (Sigma-Aldrich). The cells were placed on ice, washed in PBS^{++}, and lysed in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% BSA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100. The amount of cell-associated biotinylated transferrin was determined by ELISA, as in the endocytosis assay.

Anterograde E-cadherin transport. The retention using selective hooks (RUSH) system was used to quantify anterograde transport of E-cadherin, as previously described[41]. For further details, see Supplementary Information.

Asymmetric liposomes produced by inverted emulsion. Lipids and reagents. Egg phosphatidylcholine (EPC), cholesterol, L-α-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P_2) and brain total lipid extract were purchased from Avanti Polar Lipids. Ceramide trihexosides (Gb3) was purchased from Matreya LLC. All chemicals, including mineral oil were purchased from Sigma Aldrich unless specified otherwise.

Buffer composition. Inside buffer: 25 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA and 75 mM sucrose. Outside buffer: 25 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 0.05 mg ml^{-1} β-casein and 75 mM glucose.

Liposome preparation. Asymmetric liposomes were obtained using an inverted emulsion technique[42,43]. Lipids were dissolved in mineral oil at a total concentration of 0.5 mg ml^{-1}, with a composition of egg phosphatidylcholine:cholesterol:Gb3 at a molar ratio of 65:30:5 (inner leaflet) or of brain total lipid extract: PtdIns(4,5)P_2 at a mass ratio of 95:5 (outer leaflet). A volume of 2.5 ml of each oil–lipid mixture was sonicated in a bath at 35 °C for 30 min at a power of 30 W, cooled and stored for 1 day at room temperature. A volume of 30 μl of the outer leaflet oil–lipid mixture was poured in a tube on top of the same volume of the outside buffer. The tube was left at room temperature for at least 2 h. In the meantime, an emulsion was obtained by mixing a volume of 250 μl of inner leaflet oil–lipid mixture with 1.25 μl of inside buffer (with or without proteins) and by pumping back-and-forth with a syringe. Then, 50 μl of this emulsion was slowly added to the top phase of the tube and immediately centrifuged at 250*g* for 5 min. Asymmetric liposomes were thus obtained at the bottom of the tube and were collected by removing the upper oil phase.

Liposome observation. Liposomes were observed with an IX70 Olympus inverted microscope equipped with a Olympus 100 oil-immersion phase-contrast objective, numerical aperture (NA) 1.35 (Olympus). Fluorescent Shiga toxin was excited by a 200 W mercury lamp (OSRAM). Images were acquired with a cooled CCD camera CoolSNAP ES (Photometrics).

Preparation of giant unilamellar vesicles. Brain total lipid extract, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[biotinyl(polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-PEG(2000)-biotin), and PtdIns(4,5)P_2 were purchased from Avanti Polar Lipids. BODIPY-TR-C5-ceramide was obtained from Molecular Probes. All reagents used to make buffers and β-casein from bovine milk (>99%) were purchased from Sigma-Aldrich.

Giant unilamellar vesicles (GUVs) were prepared by electroformation on platinum wires. Approximately 5 μl of the lipid mix, containing ~95% brain total extract, 5% PtdIns(4,5)P_2, ~0.3% DSPE-PEG(2000)-biotin and 0.5% BODIPY-TR-C5-ceramide (all molar fractions), was deposited on platinum wires at 3 g l^{-1}, and dried under vacuum for 1 h. GUVs were grown overnight in a mixture of 200 mM sucrose, 50 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4, at $v = 500$ Hz, $I = 0.25$ V, $t = 4$ °C.

Tether-pulling experiments and data analysis. An experimental chamber, consisting of two parallel coverslips, spaced a few millimetres from each another, was immersed in a 5 g l^{-1} solution of β-casein for 30 min to passivate the glass surface. The chamber was filled with 5–10 μl of the electroformation solution and 200 μl buffer solution (200 mM glucose, 50 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4). The chamber was sealed with oil after ~10 min to prevent evaporation. GUVs with visible fluctuations were aspirated in a micropipette. Membrane tension was controlled via the aspiration pressure. A tether was created by bringing in contact the GUV with a streptavidin-coated polystyrene bead, approximately 3 μm in diameter (Spherotec), trapped with optical tweezers. Using another micropipette, endoA2 was injected in the vicinity of the GUV (at bulk concentrations in the micropipette 0.3–5 μM per monomer for the wild type and 5–7 μM for the endoA2ΔH0 mutant). The force measurements were then repeated.

Pulling-force induced fission. After a scaffold has formed, confirmed with the drop in force, the source of the protein was removed and the tether was further elongated at a rate of 0.5 μm s^{-1}.

The radius of the tube was determined from the intensity of the fluorescence signal of the tube, considering that the ratio of fluorescence intensities of lipids inside the tube and inside the vesicle is proportional to the surface of the tube. To get absolute values, we used a normalization factor determined previously[44].

Image quantifications. All image quantifications were performed with ImageJ or Fiji (NIH) and Matlab (MathWorks).

Quantification of STxB transport to the Golgi apparatus. *Z*-stacks were acquired on images of cells in defined experimental conditions. STxB–Cy3 fluorescence intensities were measured with ImageJ software (NIH) on *z*-projections, either from the entire cell, or from the Golgi region, as defined by giantin labelling. The ratio was then calculated as an index of Golgi localization.

Quantification of transferrin-Alexa488 endocytosis. The mean intensity of transferrin-Alexa488 fluorescence in the cell area was measured with ImageJ software (NIH) as above on *z*-projections, after background correction. Mean fluorescence intensities of control conditions were considered as 100%.

Quantification of colocalization on TIRF images. To quantify the colocalization between two channels, an object-based method was used, as implemented in JACoP[45], based on the coincidence between two centroids with a 0.5 pixel tolerance. This was achieved in an ImageJ macro by first segmenting the tagged proteins by spot detection in each channel, finding their position, and growing them by dilation to 0.5 pixel radius. The spot detection consisted in finding maxima on the smoothed image (3 × 3 average filter) using the 'find maxima' plugin of ImageJ, whose noise tolerance parameter was set up visually independently for each channel. The results were expressed as the percentage of colocalized spots over the total number of spots in the red and the green channel, respectively.

Quantification of endoA2–GFP recruitment to the plasma membrane. Spinning disk time series at fixed *z*-positions were acquired for 80 s at 37 °C with 0.84 s intervals and an exposure time of 80 ms for each channel. STxB was added 15 s after the beginning of each time series. Images were then treated with Fiji. Plasma membrane segments were selected randomly and linear regions of interest (ROI) were drawn. The mean fluorescence along ROI was measured in each channel over all images of a time series. Data were plotted for fluorescence intensity (in percentage of maximum intensity) over time (in seconds).

Quantification of endoA2 spot lifetime. Kymographs were obtained from image stacks using MetaMorph Software. Kymographs were processed using a first Fiji macro. The first step consisted in the creation of background images that were subtracted from the original images. Background images were obtained using the 'remove outliers' plugin with a 5-pixel radius and a 50 grey level threshold. An automatic threshold was then proposed and adjusted visually to select the tracks. Selected tracks were saved in ROI files for each image. A second macro was then used to measure the length of tracks, with a step allowing manual correction of ROI, if required. The lifetime of each structure was extracted from the length of the bounding boxes of the segmented tracks in the kymographs, corresponding to their length in frames.

Quantification of STxB-induced tubule length. The quantification of STxB-induced tubule length was achieved in batch for all images by segmenting the tubular structures and skeletonizing them so that the number of pixels of tubules was proportional to their length. For this, we used a Fiji macro based on the enhancement of tubular structures by computing eigenvalues of the hessian matrix on a Gaussian filtered version of the image (sigma = 1 pixel), as implemented in the tubeness plugin. The tubules were then thresholded and structures containing less than 3 pixels were discarded. A visual check was performed and a manual correction of segmented tubules was done, if required. The segmented and corrected structures were then reduced to a 1-pixel thick skeleton, using the Fiji plugin 'skeletonize'. Data were grouped by conditions and the length of skeletonized tubules in pixels was converted in micrometer units using Matlab (MathWorks).

Statistical analyses. All statistical analyses were performed using Prism v4.0 software (Graphpad Inc). Data were tested for Gaussian distribution with Kolmogorov–Smirnov test (with Dallal–Wilkinson–Lillie for *P* value). In case of non-Gaussian distribution, the following non-parametric tests were used: two-tailed Mann–Whitney *U* test if there were only two conditions or one-way ANOVA (Kruskal–Wallis test) with a Dunn's test if there were more than two data groups to compare. In case of Gaussian distribution, the following parametric tests were used: two-tailed *t*-test for the comparison of the means if there were only two conditions to compare, parametric one-way ANOVA with a Bonferroni test if there were more than two data groups. Significance of mean comparison is represented on the graphs by asterisks. All error bars denote s.e.m. No statistical method was used to predetermine sample size.

29. Zha, X. *et al.* Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *J. Cell Biol.* **140,** 39–47 (1998).
30. Lizárraga, F. *et al.* Diaphanous-related formins are required for invadopodia formation and invasion of breast tumor cells. *Cancer Res.* **69,** 2792–2800 (2009).
31. Riedl, J. *et al.* Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods* **5,** 605–607 (2008).
32. Jordan, M., Schallhorn, A. & Wurm, F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* **24,** 596–601 (1996).
33. Montagnac, G. *et al.* Decoupling of activation and effector binding underlies ARF6 priming of fast endocytic recycling. *Curr. Biol.* **21,** 574–579 (2011).
34. Mallard, F. & Johannes, L. in *Shiga Toxin Methods and Protocols* Vol. 73 (eds Philpott, D. & Ebel, F.) Ch. 17, 209–220 (Humana Press, 2003).
35. Gortat, A., San-Roman, M. J., Vannier, C. & Schmidt, A. A. Single point mutation in Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) sequence of endophilin impairs dimerization, membrane shaping, and Src homology 3 domain-mediated partnership. *J. Biol. Chem.* **287,** 4232–4247 (2012).
36. Amessou, M., Popoff, V., Yelamos, B., Saint-Pol, A. & Johannes, L. Measuring retrograde transport to the *trans*-Golgi network. *Curr. Protoc. Cell. Biol.* **Chapter 15,** Unit–15.10 (2006).
37. Singh, R. D. *et al.* Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol. Biol. Cell* **14,** 3254–3265 (2003).
38. Wolf, A. A. *et al.* Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *J. Cell Biol.* **141,** 917–927 (1998).
39. Stechmann, B. *et al.* Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenges. *Cell* **141,** 231–242 (2010).
40. Robinson, M. S. & Hirst, J. Rapid inactivation of proteins by knocksideways. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **61,** 15.20.1–15.20.7 (2013).
41. Boncompain, G. & Perez, F. Synchronizing protein transport in the secretory pathway. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 15,** Unit–15.19 (2012).
42. Pautot, S., Frisken, B. J. & Weitz, D. A. Engineering asymmetric vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100,** 10718–10721 (2003).
43. Pontani, L. L. *et al.* Reconstitution of an actin cortex inside a liposome. *Biophys. J.* **96,** 192–198 (2009).
44. Sorre, B. *et al.* Nature of curvature coupling of amphiphysin with membranes depends on its bound density. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109,** 173–178 (2012).
45. Bolte, S. & Cordelieres, F. P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224,** 213–232 (2006).

Chapitre 5

Etude de l'effet de la myosine II sur un cortex d'actine biomimétique

Sommaire

5.1 Formation d'un cortex d'actine sur liposome 104
5.1.1 Polymérisation sur liposome 104
5.1.2 Polymérisation en solution 109
5.1.3 Le système biomimétique 109
5.2 Les résultats 112
5.2.1 La polymérisation de l'actine en présence de CP 112
5.2.2 Dynamique de rétraction du cortex stabilisé d'actine par la myosine 114
5.2.3 Contraction d'un réseau dynamique d'actine par la myosine . . . 116
5.2.4 Dynamique de la tension de contraction sur un doublet de liposome 117
5.3 Conclusion 124
5.4 Article 3 : Actin polymerization or myosin contraction : two ways to build up cortical tension for symmetry breaking 125
5.5 Article 4 : Cell-sized liposome doublets reveal active cortical tension build up. 135

Lorsqu'elles sont en mouvement ou au sein d'un tissu, les cellules sont capables de se polariser grâce à des mécanismes biochimiques complexes basés sur la capacité de l'actine et des myosines à réorganiser le cytosquelette d'actine (chapitre 1). Afin de caractériser les mécanismes des mouvements impliqués dans l'établissement de la polarité cellulaire, nous avons reconstitué des systèmes *in vitro* reproduisant les différentes étapes de la motilité cellulaire. Nous avons mis au point des systèmes biomimétiques à base de liposomes afin de reproduire la membrane plasmique, le support physiologique du cortex d'actine. Ces systèmes se contractent sous l'effet de la myosine II ou se déforment sous l'effet de la polymérisation du cortex d'actine. Nous avons ainsi pu montrer que les contraintes mécaniques présentes dans le cortex peuvent être induites par la polymérisation de l'actine localisée à la membrane ou de manière indépendante par les forces de contraction exercées par la myosine sur le cortex. La brisure de symétrie apparaît lorsque la tension corticale atteint une valeur seuil qui induit, par la rupture du réseau d'actine, la polarisation du système (chapitre 2). Ces systèmes simplifiés, en

plus de découpler le rôle de l'actine de celui de la myosine, nous ont permis de suivre dynamiquement et de quantifier l'augmentation des contraintes mécaniques à l'origine de la contraction du cortex d'actine. Processus capable, à lui seul, d'induire une modification de l'organisation du cytosquelette d'actine et d'initier alors une directionnalité à la cellule. Dans ce chapitre je présente les systèmes biomimétiques développés pour ces travaux puis les résultats obtenus.

5.1 Formation d'un cortex d'actine sur liposome

De manière à mimer le cortex d'actine qui se trouve proche de la membrane plasmique, nous formons un réseau d'actine à la surface d'un liposome. Nous avons reconstitué deux types de réseaux d'actine, l'un est dynamique et permet à l'actine de polymériser directement sur la membrane du liposome alors que l'autre est fixé sur le liposome après avoir polymérisé. On détaille, aux paragraphes suivants, la manière d'obtenir ces deux types de cortex.

Dans cette étude, les liposomes sont formés par électroformation (Chapitre :2). Ils sont composés d'un mélange à 99,9% molaire d'EPC de 0,1% molaire de PEG-biot. Le lipide biotinylé sert de point d'ancrage à l'activateur de la polymérisation de l'actine, S-pVCA, qui possède une étiquette streptavidine.

Il est aussi possible d'obtenir les mêmes résultats avec des liposomes formés par émulsion inverse. Cependant, afin de retrouver des conditions de polymérisation à leurs surfaces, équivalentes à celles que l'on observe sur les liposomes électroformés, le mélange de lipides est modifié en augmentant la quantité de lipides biotinylés à 1% molaire.

5.1.1 Polymérisation sur liposome

La méthode que l'on décrit dans cette partie permet de reconstituer à la membrane d'un liposome un réseau branché d'actine à partir de monomères. L'actine-G en solution forme un réseau branché grâce au recrutement du complexe Arp2/3 à la membrane par l'activateur S-pVCA. Il s'agit du domaine VCA de WASP sur lequel a été rajouté une streptavidine afin de pouvoir lier cette protéine à un lipide biotinylé présent dans la membrane des liposomes. Comme nous l'avons expliqué au chapitre 1, cette construction permet à l'activateur d'être à tout moment dans une configuration active. La profiline est ajoutée au mélange de protéines pour empêcher la formation d'oligomère d'actine en solution, ce qui permet à l'actine de polymériser uniquement à la surface du liposome, le seul endroit ou se trouve S-pVCA (FIG :5.1).

Réseau d'actine sans CP

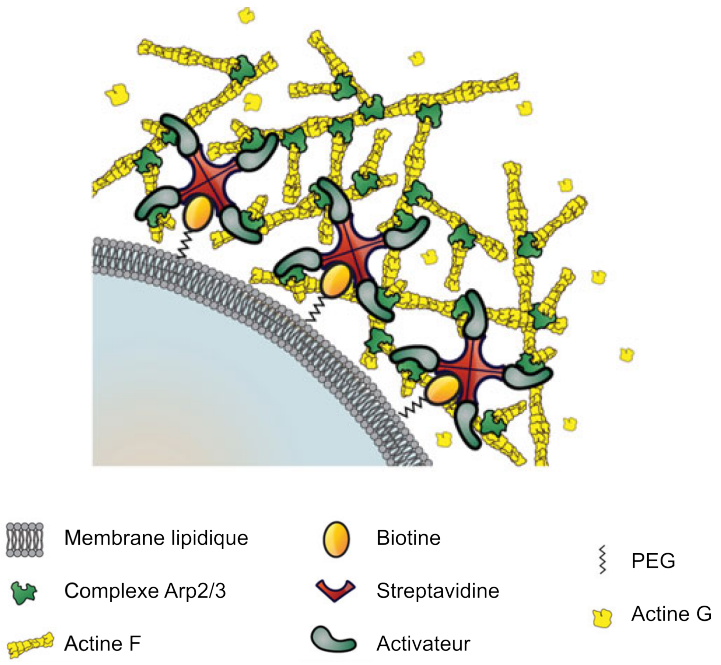


FIGURE 5.1 – Schéma représentant l'ensemble des protéines qui contribuent à polymériser un réseau branché d'actine à la surface d'un liposome sans ajout de CP. Des lipides biotinylés sont ajoutés à la composition lipidique de manière à pouvoir ancrer l'activateur S-pVCA à la membrane. Avant d'injecter les protéines nécessaires à la polymérisation de l'actine le milieu est rincé pour éliminer les protéines S-pVCA qui ne se seraient pas liées à une membrane. L'activation du complexe Arp2/3 est donc uniquement localisée à la surface lipidique où il entraine la formation d'un réseau branché d'actine.

Le protocole détaillé est donné en Annexe D. Lorsque l'on injecte le cocktail de protéines (actine-G, profiline et le complexe Arp2/3) sur un liposome pré-incubé avec S-pVCA on observe la formation, au bout d'une dizaine de minutes, du cortex à sa surface (FIG :5.2). On montre, FIG :5.3, le suivi de l'intensité de fluorescence sur le même liposome au cours du temps. Dans ces conditions biochimiques le réseau croît sans développer de contrainte mécanique et forme de longs faisceaux pouvant mesurer plusieurs micromètres de long. L'absence d'accumulation de contraintes empêche l'apparition d'une brisure de symétrie. La force produite par la polymérisation de l'actine est uniquement utilisée pour contrer la force de viscosité de la solution lors de l'élongation des filaments d'actine. On observe la croissance d'un réseau homogène d'actine autour du liposome (FIG :5.2).

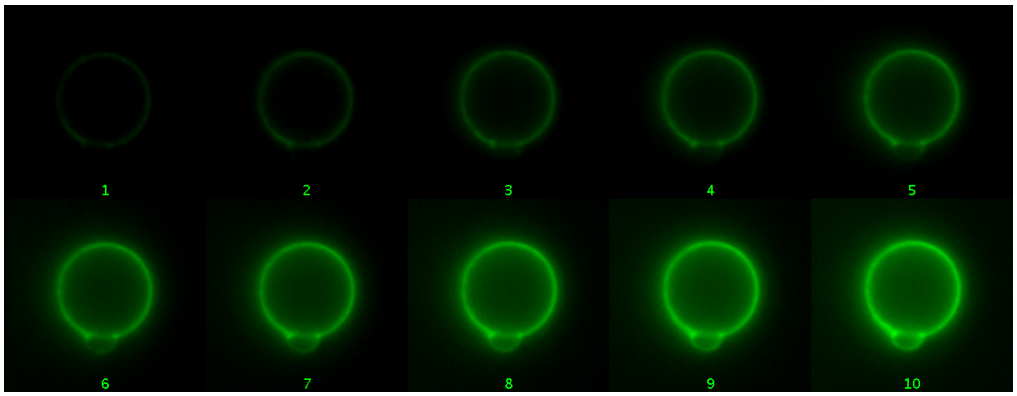


FIGURE 5.2 – Observation en épifluorescence de la croissance d'un réseau d'actine fluorescente (A-488) à la surface d'un liposome. Intervalle de temps entre les images : 2 minutes

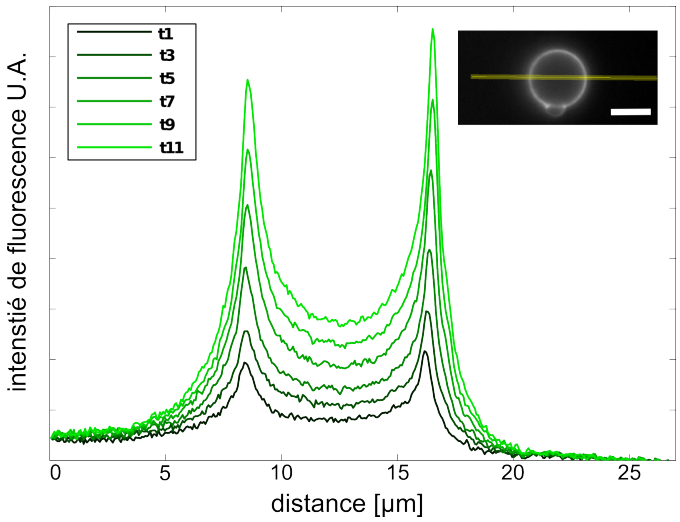


FIGURE 5.3 – Quantification de la croissance du réseau d'actine, au cours du temps, le long d'une ligne traversant le liposome comme indiqué dans l'image insérée en haut à droite. L'intensité de fluorescence de l'actine est tracée toutes les 4 minutes, du vert le plus foncé au vert le plus clair. Echelle 5 µm.

Réseau d'actine avec CP

L'ajout de la CP, dans le mélange de protéines change la morphologie du réseau d'actine (FIG :5.4). La CP permet de limiter la longueur des filaments d'actine. En augmentant la concentration en CP le réseau d'actine devient plus fin et plus dense, comme le montre les profils d'intensité de la FIG :5.5. Comme cela a déjà été montré sur des billes, en présence de CP, le réseau d'actine est capable d'accumuler des contraintes mécaniques et devient hétérogène [Kawska *et al.* 2012]. Il est aussi à noter qu'une trop forte concentration en CP empêche la formation d'un réseau d'actine. En réduisant trop fortement la longueur des filaments d'actine ceux-ci ne peuvent plus s'entremêler pour former un réseau.

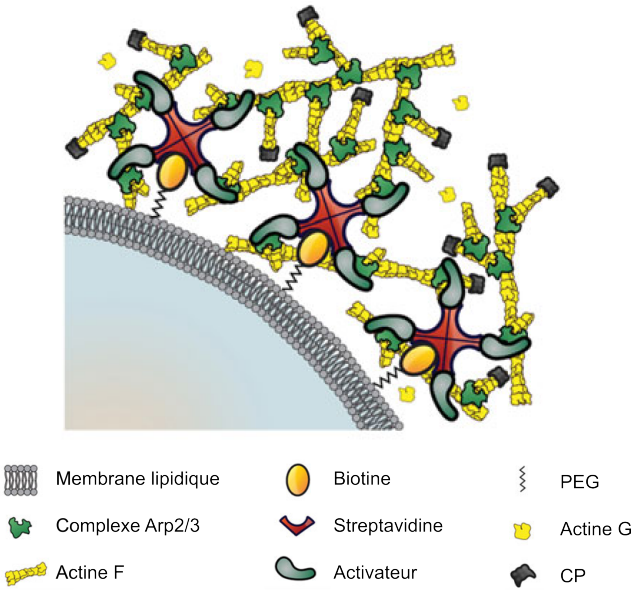


FIGURE 5.4 – Schéma représentant l'ensemble des protéines qui contribuent à polymériser un réseau branché d'actine à la surface d'un liposome en présence de CP. La CP limite la longueur des filaments d'actine et contribue à densifier le réseau d'actine.

Il est aussi possible de faire polymériser un réseau d'actine à la surface interne d'un liposome (FIG :5.6). Il suffit d'encapsuler, lorsque l'on forme des liposomes par émulsion inverse, le même mélange de protéines (S-pVCA, Actine-G, profiline, le complexe Arp2/3 et la CP). Cependant, avec ou sans CP, l'épaisseur du réseau est restreinte par la quantité limitée en protéines que peut contenir le liposome et il est très difficile de distinguer un cortex avec ou sans CP. Dans la suite de ce chapitre, les liposomes sont toujours recouverts, à leur surface extérieure, du cortex.

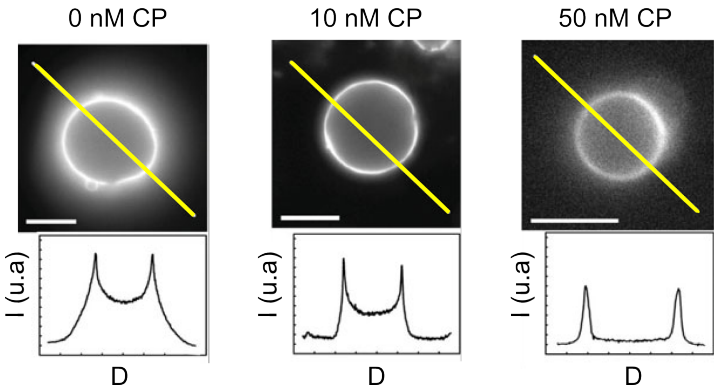


FIGURE 5.5 – Effet de la CP sur le réseau d'actine polymérisée à la surface d'un liposome. La concentration en CP est indiquée au dessus des images, en épifluorescences, des liposomes recouverts d'actine fluorescente. En dessous est tracé le profil d'intensité le long de la ligne jaune traversant les liposomes. Plus la concentration de CP est élevée et plus le réseau est fin. Echelle 10 µm.

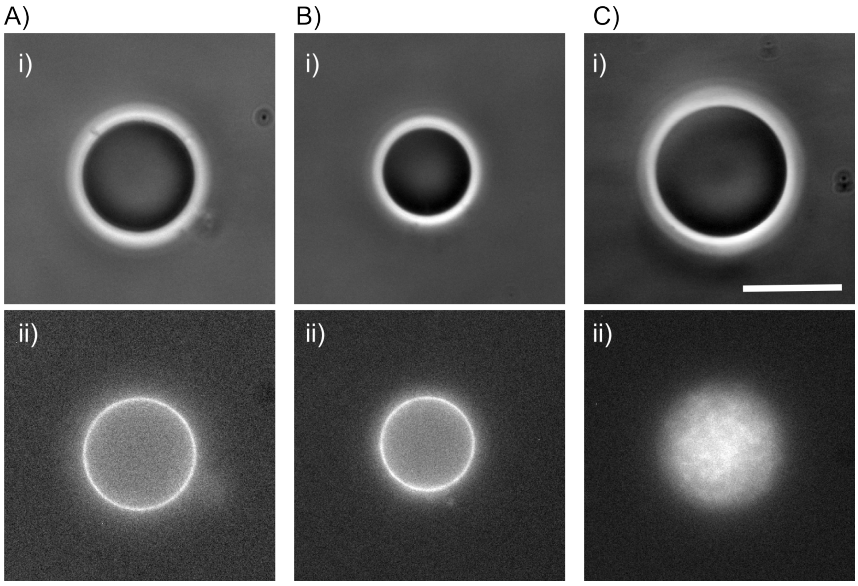


FIGURE 5.6 – Polymérisation d'un cortex d'actine à la surface interne de liposomes formés par émulsion inverse. i) Contraste de phase, ii) images en épifluorescence d'actine marquée à l'Alexa A-488. A) Le liposome contient l'activateur de la polymérisation, le complexe Arp2/3, l'actine-G et la profiline. B) Le mix de protéines encapsulé est le même que pour A) auquel est ajouté 37 nM de CP. C) Le mix de protéines ne contient pas le complexe Arp2/3, l'actine ne polymérise pas et reste répartie de manière homogène dans le liposome. Les expériences sont effectuées sans ajout de pore à la membrane. Echelle 10 µm.

5.1.2 Polymérisation en solution

Pour se soustraire de l'effet de la dynamique de polymérisation il est intéressant de pouvoir former un cortex d'actine stabilisé. Dans ce cas, l'actine-G est polymérisée en solution avec presque les mêmes protéines que celles utilisées pour la polymérisation sur une membrane de liposome : le complexe Arp2/3, la profiline et l'activateur auxquels est rajouté de l'actine monomérique biotinylée. Une fois les filaments d'actine formés, ils sont stabilisés à la phalloïdine puis incubés avec les liposomes pré-incubés à la streptavidine. De cette manière, les filaments d'actine biotinylés s'accrochent à la membrane du liposome qui contient des PEG-biot via une streptavidine. Le protocole détaillé est donné en Annexe D. Il permet d'obtenir des filaments d'actine biotinylés de quelques micromètres de long. Contrairement à la méthode précédente, les filaments d'actine sont réticulés. Le couple streptavidine/biotine, en plus de lier les filaments à la membrane, permet de servir de réticulant entre deux filaments d'actine. En effet, la streptavidine est capable de se lier à quatre biotines, ce qui peut permettre à un filament de s'ancrer à la membrane et/ou de s'attacher à un autre filament d'actine biotinylé (FIG :5.7).

Cette méthode comporte une étape durant laquelle on rince l'échantillon. Il n'y a donc plus d'actine-F en solution. Ceci, plus la présence de la phalloïdine empêchent donc le réseau d'actine de croître ou de dépolymériser au cours du temps. Sans ajout de moteurs moléculaires ce système est donc extrêmement stable et n'engendre aucune déformation du liposome.

5.1.3 Le système biomimétique

Afin de suivre en 3D et de quantifier la vitesse de pelage d'un liposome, recouvert d'un cortex d'actine, par la myosine il est nécessaire de pouvoir visualiser au cours du temps, en plus de l'actine, le liposome au spinning disk. Dans un premier temps nous avons ajouté des fluorophores au mélange lipidique pour marquer la membrane du liposome. Malgré plusieurs essais et les différents marqueurs membranaire utilisés tels que le Texas Red DHPE (FIG :5.8) ou le C18-DiI (FIG :5.9), leur présence empêche d'obtenir de manière reproductible un cortex d'actine à la surface des liposomes, que ce soit par polymérisation ou par fixation (FIG :5.10,A & B). Au lieu de chercher à marquer les membranes nous avons donc marqué l'intérieur des liposomes en encapsulant une molécule qui ne peut pas traverser une membrane lipidique, la sulforhodamine B (SRB) (FIG :5.10, C). La concentration de SRB choisie permet d'avoir une fluorescence homogène de l'intérieur du liposome et d'éviter qu'elle ne s'agrège dans le liposome. Elle est insérée dans les liposomes durant l'électroformation, ce n'est seulement que par rinçage que l'on élimine la SRB présente dans la solution extérieure.

La myosine II est conservée dans du glycérol. Avant chaque utilisation il est donc

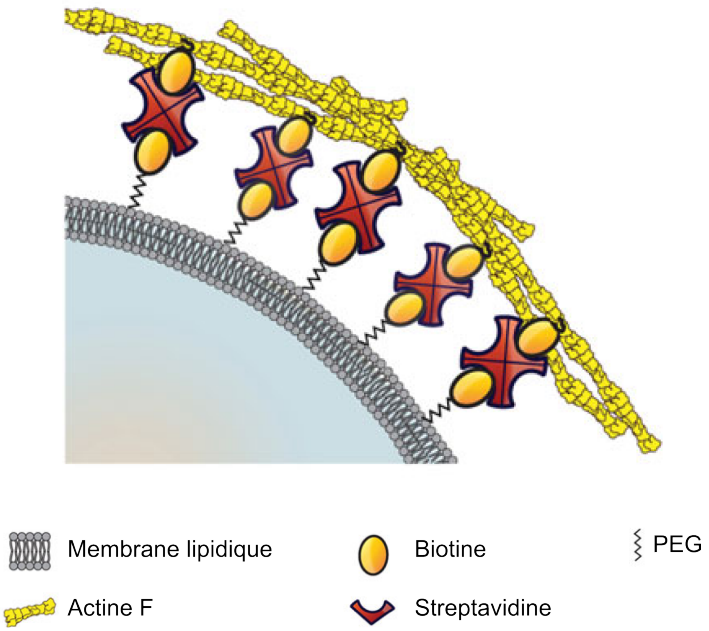


FIGURE 5.7 – Schéma représentant l'ensemble des protéines impliquées dans la formation d'un cortex d'actine stabilisé à la membrane d'un liposome. La streptavidine permet de lier les filaments d'actine biotinylés entre-eux (non montré) et à la membrane.

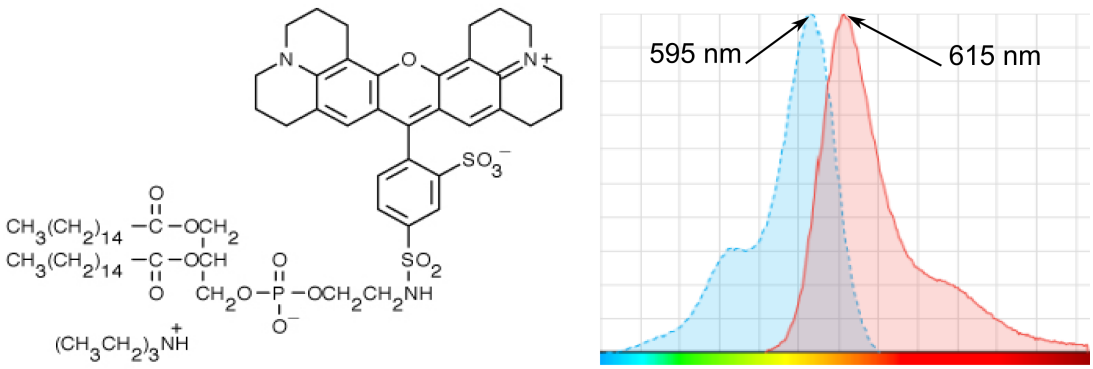


FIGURE 5.8 – Formule chimique et spectre d'absorption/d'émission du 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Texas Red®DHPE), appelé Texas Red. D'après http ://www.lifetechnologies.com.

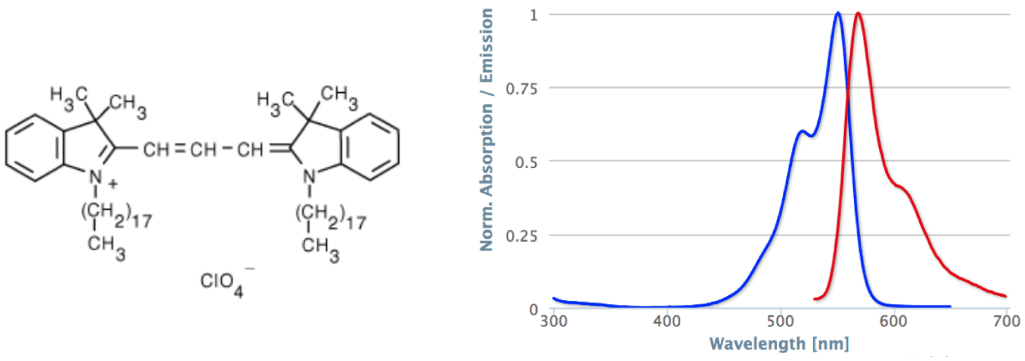


FIGURE 5.9 – Formule chimique et spectre d'absorption/d'émission du C18-DiI. D'après http ://www.fluorophores.tugraz.at.

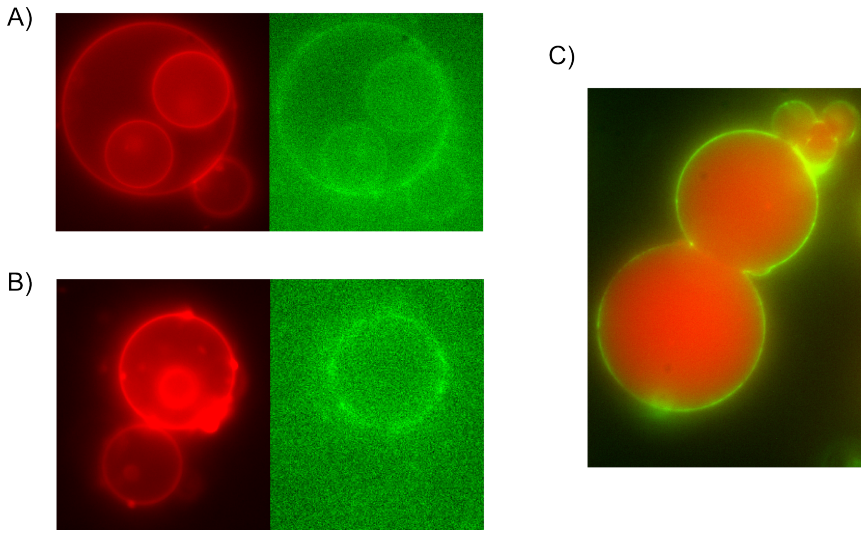


FIGURE 5.10 – Marquage de la membrane du liposome en rouge, avec un cortex d'actine en vert, stabilisé sur la membrane extérieure des liposomes. A) Avec le marqueur C18-DiI la fluorescence déborde sur celle de l'actine A-488 et la liaison de l'actine à la membrane est trop faible. B) Avec le Texas Red DHPE, l'ancrage des filaments d'actine à la membrane est trop faible. C) Avec la sulforhodamine B encapsulée dans le liposome à 0,9 µM, en plus de pouvoir clairement délimiter les contours du liposome, la liaison à la membrane du cortex reste parfaite.

nécessaire de passer par une étape de dialyse afin que la myosine soit dans un tampon proche de celui dans lequel se trouve les liposomes et permettant aux moteurs moléculaires de fonctionner. Afin d'éliminer les agrégats de myosines II, chaque jour, l'échantillon contenant les moteurs moléculaires est ultra-centrifugé 30 minutes à 100'000 rpm, et l'on ne récupère que le surnageant, les myosines non fonctionnelles étant éliminées dans le culot.

5.2 Les résultats

5.2.1 La polymérisation de l'actine en présence de CP

Sans CP, dans le mélange biochimique permettant à la polymérisation de l'actine, le réseau à la surface du liposome croît et reste homogène. Dans ces conditions aucune brisure de symétrie n'est observée (FIG :5.5). Lorsque la CP est ajoutée, l'élongation des filaments branchés d'actine est limitée comme le montre la décroissance des profils en intensité de fluorescence en dehors des liposomes (FIG :5.5). Cependant, comme la polymérisation de l'actine continue aux sites d'activation S-pVCA ancrés dans la membrane du liposome, les filaments enchevêtres d'actine sont poussés vers l'extérieur et forment un réseau cohésif d'actine [Sykes & Plastino 2010]. Initialement le réseau reste homogène jusqu'à ce que le liposome se déforme et que la brisure de sysmétrie apparaisse (FIG :5.11). Ce phénomène de brisure est semblable à ce qui a été observé sur des billes [van der Gucht *et al.* 2005] et [Kawska *et al.* 2012]. La contrainte mécanique au sein du réseau d'actine augmente avec la polymérisation de l'actine jusqu'à ce qu'elle atteigne une valeur critique qui entraîne la brisure du réseau.

Une fois que la brisure a lieu, le liposome est expulsé du réseau d'actine créant un mouvement de propulsion. Ce phénomène crée une comète qui pousse le liposome et le propulse en le pinçant selon le même principe que ce qui a été étudié précédemment dans [Plastino & Sykes 2005] et [van der Gucht *et al.* 2005]. Lorsque l'on observe l'état du réseau d'actine en fonction du temps, on remarque que le temps nécessaire à l'apparition de la brisure de symétrie augmente de manière linéaire avec la taille des liposomes et dépend de la concentration en CP (FIG :5.11,B & C).

Dans ces expériences, contrairement à celles effectuées sur des billes rigides de polystyrène, sur liposomes nous pouvons observer des déformations dues à l'accumulation de contraintes avant que la brisure de symétrie n'intervienne. Cependant, en présence d'une trop grande concentration en CP (50 nM dans notre cas FIG :5.11), le réseau d'actine n'est plus suffisamment enchevêtré pour pouvoir accumuler de la tension. Dans ce cas la brisure de symétrie n'intervient plus. Ce résultat montre que le phénomène de brisure de symétrie sur liposome a uniquement lieu dans une fenêtre de concentration

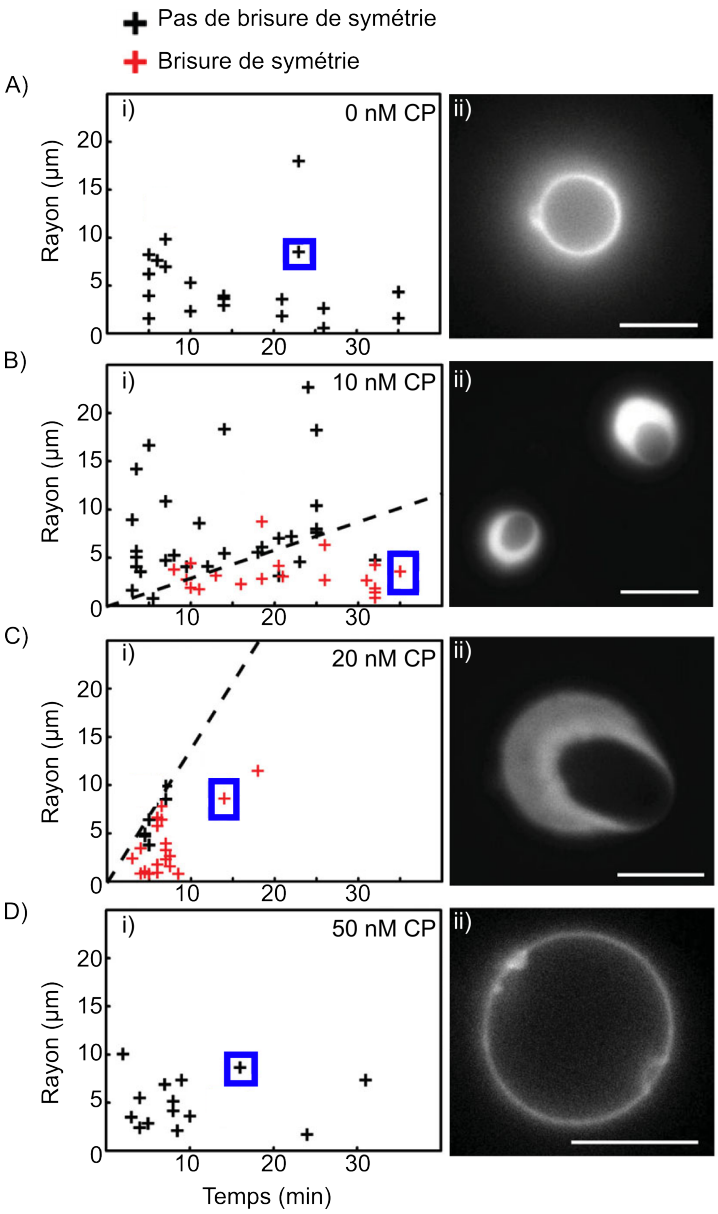


FIGURE 5.11 – La polymérisation d'un réseau d'actine autour d'un liposome peut entrainer une brisure de symétrie. ii) Images A-B-D) en épifluorescence, C) au spinning disk. Le temps 0 correspond à l'initiation de la polymérisation de 1 µM d'actine en présence de 50 nM d'Arp2/3, 3 µM de profiline et de la concentration en CP indiquée. i) chaque liposome est représenté par une croix. La taille des liposomes en fonction du temps est représentée graphiquement, pour chaque concentration en CP, en rouge si la brisure de symétrie a eu lieu ou en noir si le réseau d'actine est homogène. La ligne en pointillés noirs indique la limite entre les réseaux brisés ou pas. Les données entourées d'un cadre en bleu sont les liposomes représentés en ii). A-D) Aucune brisure contrairement à C-D). Echelles 10 µm.

en CP : au dessus de 0 nM et en dessous de 50 nM pour notre système.

5.2.2 Dynamique de rétraction du cortex stabilisé d'actine par la myosine

Afin d'examiner les différences entre les forces de polymérisation de l'actine et les forces dues à la contraction de l'acto-myosine nous avons utilisé le système biomimétique présenté au paragraphe :5.1.3. Il s'agit d'un liposome sur lequel est attaché un cortex d'actine stabilisé à la phalloïdine que nous mettons en présence de myosine II. En absence de moteur moléculaire ce système ne crée ni de tension, ni de déformation ni de brisure de symétrie. Cependant, après l'injection de myosine II le réseau d'actine se contracte et finit par se rompre.

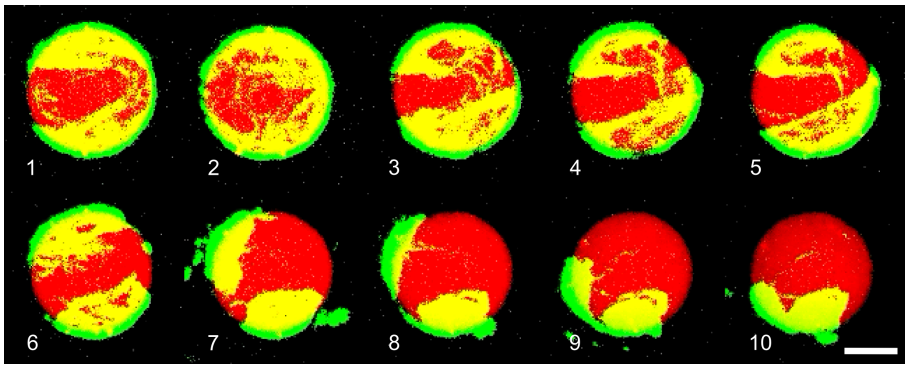


FIGURE 5.12 – Reconstruction en 3D de la rétraction des filaments d'actine organisés en cortex autour d'un liposome et observée au microscope spinning disk. Chronophotographie de 14 secondes, l'actine (en vert) est contractée par l'injection de myosine II et dévoile le liposome (en rouge) pour enfin se concentrer en un seul endroit. Echelle 5 µm.

Nous avons tout d'abord caractérisé la rétraction du cortex d'actine sous l'influence de la myosine II. En effet, après l'injection de la myosine dans l'environnement proche d'un liposome recouvert d'un réseau d'actine ce dernier se contracte, finit par briser et dénude le liposome. Ce comportement est appelé le "peeling" (FIG :5.12).

Nous avons mis en évidence que le temps, au bout duquel la brisure de symétrie intervient est indépendant de la taille des liposomes. Cependant, ce délai est modifié lorsque l'on change la concentration en myosine injectée. On peut ainsi passer d'une attente de 3 à 17 minutes avant l'apparition de la contraction, en injectant de la myosine respectivement à 2 ou 200 nM. Ce phénomène semble indiquer que la contraction nécessite, de la part du réseau d'actine, une valeur seuil de mise sous tension qu'il

atteint plus rapidement lorsqu'il y a plus de moteurs moléculaires.

De manière plus inattendue la durée du peeling reste, elle, complètement indépendante de la concentration en myosine. Le phénomène se déroule en environ une minute et toujours à une vitesse de l'ordre de 14 µm.min^{-1} et ceci, encore une fois, indépendamment de la concentration en myosine. Cette durée constante de peeling, malgré les variations de deux ordres de grandeurs de la concentration en myosine, permet de mettre en évidence que ce mécanisme est uniquement lié au réseau d'actine et semble correspondre à une relaxation purement élastique.

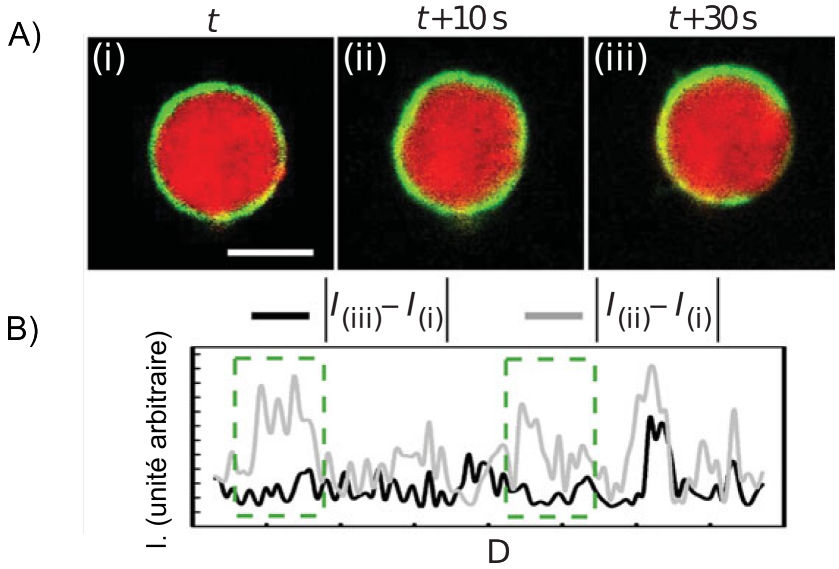


FIGURE 5.13 – A) Coupe au niveau du plan équatorial d'un liposome (en rouge) recouvert d'un réseau fixé d'actine (en vert). i) Avant l'injection de la myosine, le liposome est circulaire. ii) 10 s après l'injection de la myosine, le liposome est encore recouvert d'actine mais il est déformé par les contractions engendrées par la myosine. iii) Le réseau d'actine fini par céder, à ce moment le liposome retrouve sa forme originelle circulaire. B) Variation d'intensité du liposome le long de son périmètre (en rouge) entre les temps ii) (en gris) et iii) (en noir), en prenant i) comme référence à chaque fois. Les deux régions entourées en pointillés verts mettent en évidence les plus grandes variations d'intensités correspondant aux zones de plus grandes déformations. Echelle 5 µm.

En analysant le liposome avant que la brisure intervienne nous nous sommes aperçus que les myosines étaient capables d'engendrer une tension suffisamment forte pour le déformer. L'observation du plan équatorial d'un liposome, une fois la myosine injectée, permet de mettre en évidence cette déformation (FIG :5.13,A). A l'état initial on obtient une forme circulaire parfaite (FIG :5.13,i) mais peu de temps après l'injection

de la myosine, alors que des inhomogénéités apparaissent dans le réseau d'actine, le liposome perd sa circularité (FIG :5.13,ii). Il retrouve sa forme initiale après que le réseau d'actine a brisé (FIG :5.13,iii). La déformation du liposome est assez facilement identifiable à l'oeil mais nous voulions la quantifier.

Afin de mettre en évidence cette déformation du liposome nous avons soustrait deux images (avant et après la déformation) du plan équatorial du volume du liposome (en rouge) et tracé la valeur absolue de la variation d'intensité entre ces deux temps, le long du périmètre du liposome. Cette analyse permet de prendre en compte les déformations du contour du liposome, sur 10 pixels de large (FIG :5.13,B)). La variation d'intensité reste constante si le liposome ne se déforme pas. Au contraire, une déformation du contour engendre une augmentation de la variation d'intensité.

Malgré les différentes analyses utilisées pour mettre en place une technique robuste de quantification de ces déformations, afin de quantifier les tensions, nous ne sommes jamais parvenus à obtenir des données significatives avec ce système constitué d'un liposome unique. En effet, même si l'œil est capable de discerner rapidement et facilement les déformations que subit le liposome, il s'agit en fait de variations de quelques voxels (soit 0,108 μm^3). les valeurs de déformations obtenues se retrouvaient à chaque fois noyées dans le bruit.

5.2.3 Contraction d'un réseau dynamique d'actine par la myosine

Pour rapprocher notre système biomimétique reconstituant la contraction cellulaire du système physiologique nous avons combiné les deux approches précédemment décrites. Dans cette partie, le réseau d'actine polymérise à la surface du liposome en présence de la myosine II. Les conditions biochimiques et temporelles choisies pour cette partie de l'étude ont été choisies de manière à permettre :

- La croissance d'un réseau d'actine branché à la surface du liposome qui ne peut pas accumuler suffisamment de contraintes mécaniques et ne brisera donc pas (0 et 50 nM CP).

- D'injecter la myosine avant que la brisure de symétrie intervienne lorsque le réseau peut accumuler suffisamment de contraintes pour qu'elle ait lieu (10 nM CP).

En absence de CP, nous montrons que l'injection de myosine II n'engendre toujours pas de déformation. En effet, la polymérisation des filaments d'actine à la membrane, à 0 nM en CP, forme de longs filaments parallèles d'actine qui s'éloignent du liposome, leur taille n'étant pas régulée. La mysoine II ne peut pas contracter un réseau parallèle

d'actine orienté dans le même sens (bouts barbés vers l'extérieur dans notre cas) et ne peut pas atteindre le réseau branché qui se trouve proche de la membrane. Dans ces conditions aucune contraction n'est observable.

En présence de 10 nM de CP et avec l'injection de myosine, on retrouve la contraction du cortex et l'effet "peeling" comme on peut l'observer avec un réseau stabilisé. Cependant l'augmentation de la concentration de CP à 50 nM, même après l'injection de myosine, engendre à nouveau une perte de contraction. Dans ces conditions, il n'y a ni contraction ni brisure de symétrie car le réseau d'actine n'est pas assez entremêlé pour pouvoir accumuler de la tension. La longueur des filaments d'actine est trop faible. La brisure de symétrie apparaît dans une fenêtre de concentration en CP plus petite lorsque l'on ajoute la myosine, allant de 10 à 20 nM, contre 0 à 50 nM sans myosine.

5.2.4 Dynamique de la tension de contraction sur un doublet de liposome

L'idée de cette seconde étude est d'utiliser un système *in vitro* afin de mesurer l'effet de la contraction d'un cortex d'acto-myosine sur le changement de forme cellulaire. La méthode que nous avons développée permet, à partir d'une analyse d'image en 3D de quantifier l'augmentation de la tension corticale. Nous sommes partis de l'observation des déformations subies par un liposome unique recouvert d'un réseau d'actine lorsqu'il est mis en présence de myosine II. Cependant, l'utilisation d'un liposome unique ne permet aucune quantification des forces c'est pour cette raison que nous avons utilisé un autre système.

La méthode mise au point est issue d'une observation faite, au spinnig disk, sur deux liposomes collés et recouverts d'un cortex d'actine stabilisé. Cette structure change de forme quand de la myosine II est ajoutée (FIG :5.14,A). Nous avons alors mis au point un protocole permettant de reproduire, le doublet de liposome ainsi que cette déformation, de manière contrôlée (FIG :5.14,B) et observable au microscope à contraste de phase. Les effets, dus à la dynamique de polymérisation de l'actine, sont éliminés puisque l'on utilise, encore une fois, un réseau stabilisé à la phalloïdine (paragraphe :5.2.2 et 5.2.3 de ce chapitre). Dans cette étude on s'intéresse uniquement à la force de contraction induite par les moteurs moléculaires. Lorsque l'on injecte de la myosine au voisinage de cette structure, celle-ci se déforme jusqu'à ce que la brisure du réseau d'actine intervienne et rende sa forme originelle au doublet (FIG :5.14,A & B). Avec ce nouveau système, les déformations géométriques sont suffisamment importantes pour être détectées, mesurées et automatisées.

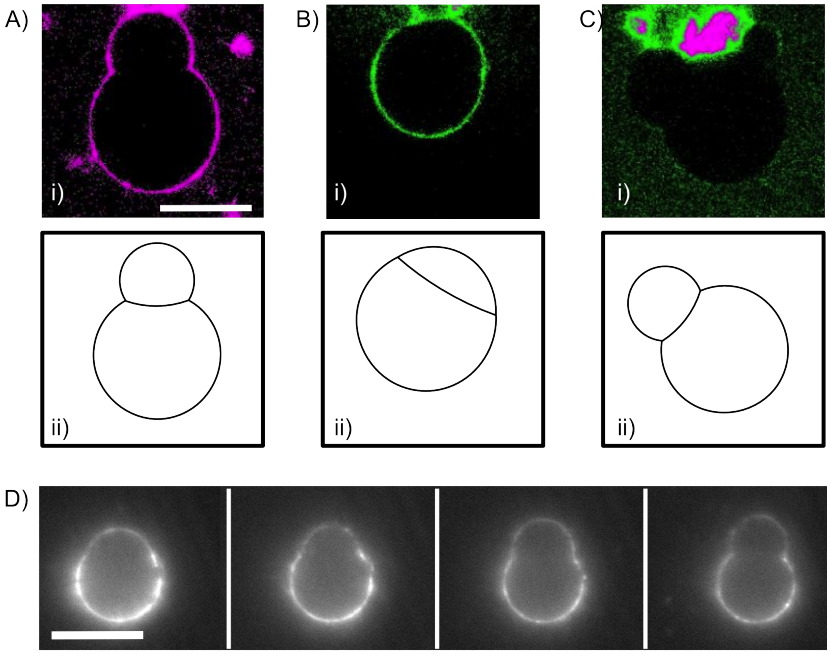


FIGURE 5.14 – i) Images au spinnig disk d'un doublet de liposome recouvert d'un cortex d'actine (vert et violet) stabilisé à la phalloïdine A) avant, B)-C) après, l'injection de la myosine II. ii) Schémas représentant la forme du doublet de liposome. La présence de la myosine sur le réseau d'actine engendre une tension qui s'applique à tout le doublet et le déforme. D) Effet de la rupture du réseau d'actine à la surface d'un doublet de liposome. La structure qui était comprimée par la contraction de la myosine retrouve sa forme originelle de doublet. Image en épifluorescence d'actine fluorescente. Barres d'echelle A-B-C) 5 µm, D) 10 µm.

Le doublet

Les liposomes électroformés sont incubés durant une dizaine de minutes avec de la streptavidine, ce qui a pour effet de coller les liposomes ensemble. Un temps trop long d'incubation donnera des agrégats de liposomes et un temps trop court ne permettra pas de former des doublets. Ce n'est qu'après avoir formé un doublet que l'on ajoute à sa surface un réseau d'actine. Avec ce procédé toute la surface se retrouve recouverte à l'exception de l'interface entre les deux liposomes (FIG :5.15). A aucun moment nous ne contrôlons la taille des liposomes qui formeront le doublet. Nous obtenons donc une population hétérogène en taille en fonction des rayons R_1 et R_2 des liposomes.

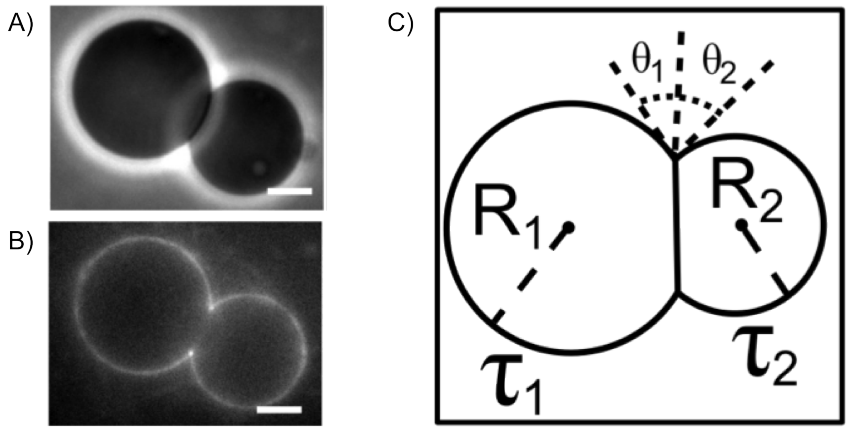


FIGURE 5.15 – A) Image au contraste de phase d'un doublet de liposome. B) Image en épifluorescence du même doublet de liposome sur lequel le réseau d'actine est fixé. On remarquera qu'il n'y a pas d'actine sur la surface de contact entre les deux liposomes. Echelle 5 µm. C) L'ensemble des paramètres physiques et géométriques d'un doublet. R_1, R_2 rayons de courbures des deux liposomes ; θ l'angle de contact entre les deux liposomes décomposable en deux angles θ_1 et θ_2 par rapport à la tangente à la surface de contact ; τ_1 et τ_2 représentent les tensions.

Une partie des expériences de cette étude est aussi effectuée au spinning disk, nous avons donc modifié encore le protocole de formation des doublets qui sont formés à partir de deux populations de liposomes suivant qu'ils contiennent de la SRB ou pas. On obtient alors un doublet bicolore (FIG :5.16) sur lequel on peut visualiser, en plus des déformations, la tangente à la surface de contact.

Variablité de l'angle de contact

Avant de chercher à quantifier la contraction nous avons vérifié que l'actine à elle seule ne modifiait aucun des paramètres géométriques du doublet. Pour cela nous

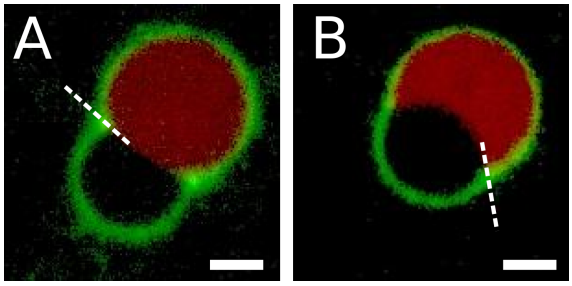


FIGURE 5.16 – Images au spinning disk du plan équatorial d'un doublet de liposome bicolore. L'actine (en vert) est fixée sur la membrane externe du liposome. De la sulforhodamine B (en rouge) est ajoutée à la solution interne d'une partie des liposomes. A) le doublet avant ou B) 2 minutes après l'injection de la myosine. Avec cette méthode de préparation des doublets on peut observer l'interface entre les deux liposomes. La tangente à la surface de contact et indiquée par une ligne en pointillés blancs. Echelle 5 µm

avons mesuré l'angle de contact θ en présence ou non d'un réseau d'actine à la surface du doublet. L'angle de contact est tout d'abord mesuré en présence d'actine, puis en sur-exposant le doublet, au rayonnement de la lampe à mercure, nous pouvons éliminer le réseau d'actine. C'est à ce moment, une fois l'actine éliminée, que nous reprenons une mesure de θ. Nous montrons ainsi que la présence de ce réseau d'actine ne déforme pas le doublet (FIG :5.17). Cependant, à la lecture de ces données hétérogènes, il est apparu plus judicieux de suivre un même doublet durant une expérience puisqu'ils n'ont pas tous les mêmes angles à l'état initial. En effet, même si θ évolue de manière significative (de plus de 30°) par l'effet de la contraction d'acto-myosine (FIG :5.16 et FIG :5.14,i) A-B-C)) on retrouve la même disparité d'angle de contact sur une population de doublet. De plus, il est nécessaire de pouvoir discerner la tangente à la surface de contact entre les deux liposomes durant l'expérience afin de distinguer θ_1 de θ_2.

C'est pour résoudre ces deux problèmes que nous avons décidé de ne travailler que sur un seul doublet à la fois et non plus sur une population et d'utiliser de la SRB, pour rendre l'intérieur d'un seul des deux liposomes fluorescent, afin d'avoir accès aux caractéristiques géométriques du doublet.

Contraction par la myosine II

Nous avons focalisé l'étude sur l'étape de contraction du doublet, avant que la brisure du réseau d'actine n'intervienne et relâche la tension. Quelques minutes après avoir injecté la myosine II, le réseau d'actine se contracte (FIG :5.19). Cette

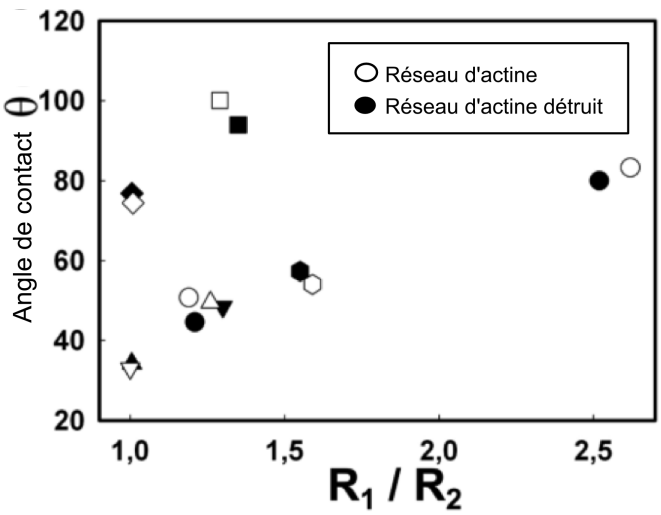


FIGURE 5.17 – Evolution de l'angle de contact θ entre les deux doublets lorsque l'on détruit le réseau d'actine en fonction du rapport des rayons des deux liposomes R_1/R_2. Malgré la grande disparité de θ pour différents doublets, son évolution, pour un doublet donné, est nulle si l'on élimine le réseau d'actine.

augmentation de la tension engendre un rapprochement des deux liposomes et modifie l'angle de contact θ qui croît. On explique ici le raisonnement qui permet de passer des caractéristiques géométriques aux mesures de tension.

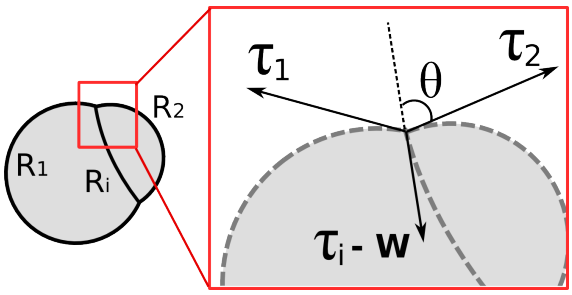


FIGURE 5.18 – Représentation de Young des tensions (τ) à l'interface entre les deux liposomes. W représente l'énergie d'adhésion.

En utilisant la loi de Young-Dupré à notre système (FIG :5.18), nous obtenons une équation qui permet de relier la tension de chacun des liposomes τ_1 et τ_2, l'angle de contact θ, ainsi que la tension à l'interface des deux liposomes τ_i. Par projection sur l'axe tangent à la surface de contact et passant par le point triple (ligne en pointillés sur la FIG :5.18) et sur un axe perpendiculaire à celui-ci nous obtenons deux équations :

$$\tau_i - W = \tau_1 \cos(\theta_1) + \tau_2 \cos(\theta_2) \tag{5.1}$$

$$\tau_1 \sin(\theta_1) = \tau_2 \sin(\theta_2) \tag{5.2}$$

L'équation 5.2 implique, que si les angles θ_1 et θ_2 sont égaux au cours de la contraction alors la tension du doublet est la même de partout $\tau_1 = \tau_2 = \tau$. Autrement dit, la tension exercée par la contraction d'acto-myosine est la même pour les deux liposomes. Dans ces conditions, que l'on vérifie expérimentalement, on peut simplifier l'équation 5.1 :

$$\tau_i - W = 2\tau \cos(\theta) \tag{5.3}$$

De plus, puisqu'il n'y a pas d'actine sur la surface de contact, nous supposons que la tension surfacique liée à cette interface reste constante $\tau_i - W$ où W représente l'énergie d'adhésion. Puisque nous saturons les lipides biotinylés par de la streptavidine en solution, même si la surface de contact évolue avec l'injection de myosine II, il ne peut pas se créer de nouveaux liens entre les deux doublets. W reste donc elle aussi constante au cours de l'expérience. Si l'on prend en compte cette hypothèse dans 5.3, on obtient :

$$2\tau \cos(\theta) = cste \implies \tau = \frac{cste}{2\cos(\theta)} \tag{5.4}$$

Cette équation est valide tant que le réseau d'actine n'a pas craqué. En se servant de la dernière acquisition d'image, avant la rupture du réseau d'actine nous avons accès à θ_F l'angle de contact maximum entre les deux liposomes. Avec la première image nous avons l'angle initial θ_I. La comparaison des paramètres géométriques entre l'instant initial (I) et juste avant la rupture (F) nous permet d'écrire le rapport des tensions :

$$\frac{\tau_F}{\tau_I} = \frac{\cos(\theta_I)}{\cos(\theta_F)} \tag{5.5}$$

Il est alors possible de remonter à la variation de tension due à l'acto-myosine au cours du temps (FIG :5.20,A)). Sur l'ensemble de nos expériences nous obtenons une augmentation du rapport $\frac{\tau_F}{\tau_I}$ de 1,2 ± 0,2 (FIG :5.20,B)). Même si initialement les angles de contacts et les rayons des liposomes sont différents, la dynamique de contraction est la même. Ainsi, nous pouvons superposer les courbes de $\theta(t)$ lorsqu'elles sont normalisées.

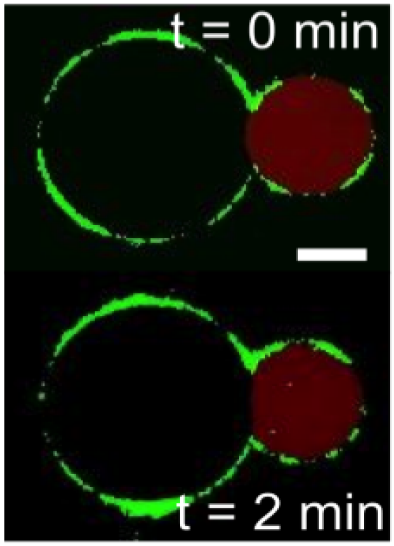


FIGURE 5.19 – Une coupe d'un doublet de liposome recouvert d'actine (en vert) avant que l'on injecte la myosine II et deux minutes plus tard. On notera le rapprochement entre les deux liposomes et la modification de l'angle de contact mis en évidence par la SRB qui remplit un seul des deux liposomes. Echelle 5 µm.

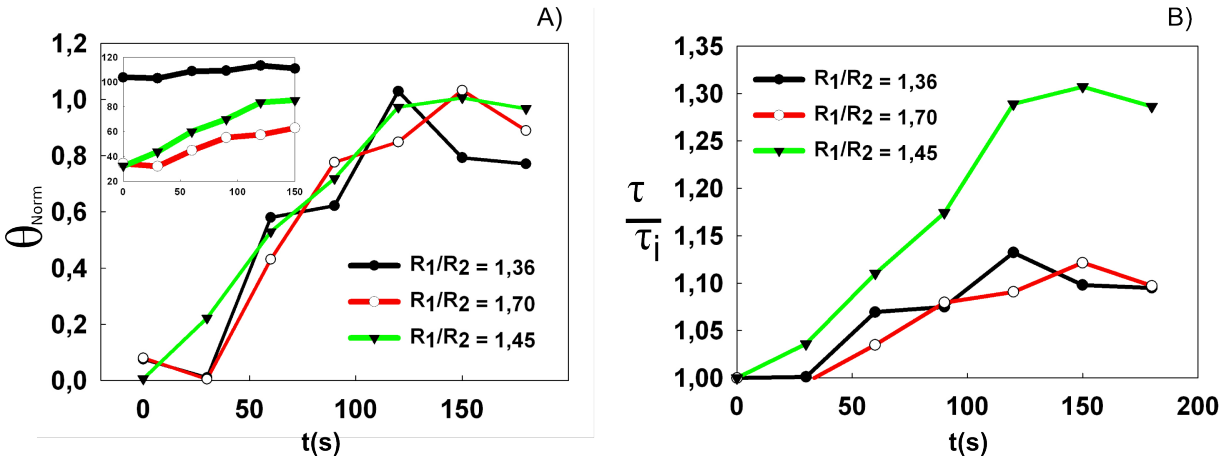


FIGURE 5.20 – A) Dans l'encadré on présente l'évolution de l'angle de contact θ au cours du temps, après l'injection, à l'instant t=0, de myosine II. Nous avons ensuite représenté l'évolution de θ en le normalisant à 1 pour sa valeur maximale, $\theta_{Norm} = (\theta(t) - \theta_{Min})/(\theta_{Max} - \theta_{Min})$. B) Évolution du rapport des tensions au cours du temps pour les trois mêmes doublets. Dans l'encadré figure le rapport des rayons pour chaque doublet.

5.3 Conclusion

Alors que l'initiation de la polarisation d'une cellule est extrêmement complexe à étudier *in vivo*, les systèmes biomimétiques que nous avons mis au point offrent une alternative à ces études. En effet, ils nous permettent de contrôler toute la biochimie, de découpler des mécanismes intrinsèquement liés *in vivo* et de pouvoir effectuer des mesures physiques sur la contraction et la polarisation cellulaire.

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'accumulation de tension au sein d'un cortex d'actine peut être engendrée par la polymérisation de l'actine dirigée à la membrane et l'activité de la myosine II. Le système minimaliste étudié étant capable de décomposer de manière totalement indépendante ces deux mécanismes. Nous avons aussi montré que la contraction et la déformation sont contrôlées par la densité du réseau d'actine et plus particulièrement par la longueur des filaments qui le constituent.

Le système du doublet de liposome et sa contraction permettent de suivre de manière dynamique l'évolution de la tension corticale sans perturber le système grâce à une mesure d'angle. Nous pouvons maintenant caractériser les effets d'autres types de myosines, tout en jouant sur les paramètres biochimiques, sur ce réseau en 3D d'actine. Afin de pousser le système un peu plus loin, il serait aussi intéressant d'élaborer, selon le même principe, un tapis de liposomes et d'étudier la contraction qu'engendrerait la myosine sur un tel système mimant un tissu cellulaire.

5.4 Article 3 : Actin polymerization or myosin contraction : two ways to build up cortical tension for symmetry breaking

Kevin Carvalho, Joël Lemière, Fahima Faqir, John Manzi, Laurent Blanchoin, Julie Plastino, Timo Betz et Cécile Sykes

Philosophical Transactions of the Royal Society B (2013)
368 : 20130005

PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY B

rstb.royalsocietypublishing.org

Research

Cite this article: Carvalho K, Lemière J, Faqir F, Manzi J, Blanchoin L, Plastino J, Betz T, Sykes C. 2013 Actin polymerization or myosin contraction: two ways to build up cortical tension for symmetry breaking. Phil Trans R Soc B 368: 20130005. http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0005

One contribution of 17 to a Discussion Meeting Issue 'Cellular polarity: from mechanisms to disease'.

Subject Areas:
biophysics, biochemistry, cellular biology

Keywords:
acto-myosin, cortical tension, symmetry breaking, biomimetic liposome

Author for correspondence:
Cécile Sykes
e-mail: cecile.sykes@curie.fr

Actin polymerization or myosin contraction: two ways to build up cortical tension for symmetry breaking

Kevin Carvalho[1,2,3], Joël Lemière[1,2,3,4], Fahima Faqir[1,2,3], John Manzi[1,2,3], Laurent Blanchoin[5], Julie Plastino[1,2,3], Timo Betz[1,2,3] and Cécile Sykes[1,2,3]

[1]Centre de Recherche, Institut Curie, Paris 75248, France
[2]Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 168, Paris 75248, France
[3]UPMC University Paris VI, Paris 75005, France
[4]Université Paris Diderot Sorbonne Paris Cité, VII, Paris 75205, France
[5]Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble 38054, France

Cells use complex biochemical pathways to drive shape changes for polarization and movement. One of these pathways is the self-assembly of actin filaments and myosin motors that together produce the forces and tensions that drive cell shape changes. Whereas the role of actin and myosin motors in cell polarization is clear, the exact mechanism of how the cortex, a thin shell of actin that is underneath the plasma membrane, can drive cell shape changes is still an open question. Here, we address this issue using biomimetic systems: the actin cortex is reconstituted on liposome membranes, in an 'outside geometry'. The actin shell is either grown from an activator of actin polymerization immobilized at the membrane by a biotin–streptavidin link, or built by simple adsorption of biotinylated actin filaments to the membrane, in the presence or absence of myosin motors. We show that tension in the actin network can be induced either by active actin polymerization on the membrane via the Arp2/3 complex or by myosin II filament pulling activity. Symmetry breaking and spontaneous polarization occur above a critical tension that opens up a crack in the actin shell. We show that this critical tension is reached by growing branched networks, nucleated by the Arp2/3 complex, in a concentration window of capping protein that limits actin filament growth and by a sufficient number of motors that pull on actin filaments. Our study provides the groundwork to understanding the physical mechanisms at work during polarization prior to cell shape modifications.

1. Introduction

In various tissues, for example epithelia, or during vertebrate development, cells are perfectly organized in a polar manner through complex mechanisms that involve biochemical reactions, self-assembly of proteins into scaffolding architectures, and mechanical tension build-up [1]. In the last decade, considerable progress has been made in the identification of the necessary proteins involved in cytoskeletal rearrangements and the establishment of polarity and motility. As a result, it is now possible to reproduce typical phenotypes *in vitro* using these basic elements and to address in detail the different mechanisms involved in polarity establishment. The actin cytoskeleton, together with myosin II, is a crucial player for cellular force production and polarization [2]. These molecular engines drive polarization by actin polymerization and myosin contraction, and their spatial distribution and how they build up tension are key phenomena driving polarization and motility [3,4]. The cell cortex, consisting of a micrometre-thick actin shell underneath the plasma membrane [5], plays a crucial role in ensuring and controlling cellular tension [6,7]. Nucleation of such networks is triggered by biochemical mechanisms, one of them involving the Arp2/3 complex [8]. This complex is activated by proteins from the WASP (Wiskott–Aldrich syndrome protein) family at the membrane where a branched and entangled network emerges [9–11].

© 2013 The Author(s) Published by the Royal Society. All rights reserved.

Royal Society Publishing
Informing the science of the future

We use biomimetic actin cortices linked to the outside of liposome membranes to address how spherical membranes and cortices that are initially symmetrical can change their shape and polarize. We show that when actin is polymerized at the membrane through the Arp2/3 complex branching mechanism, a stress builds up around the liposome that first relaxes before sustained actin polymerization can propel the liposome into directional movement, reminiscent of the onset of bead motility [11]. Similarly, membrane-attached actin filaments or branched actin networks tightened up by myosin motor activity eventually build up a tension that can relax by local breakage of the network, leading to a polarized actin network. Altogether, our results show that cortical tension around a cell-sized liposome can be generated by distinct mechanisms, all able to induce a spontaneous polarization of actin networks via symmetry breaking. In cells, analogous tension release could modify the distribution of the cytoskeleton and initiate directionality in cells.

2. Material and methods

(a) Reagents

Chemicals are purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) unless specified otherwise. L-α-Phosphatidylcholine (EPC) and 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[biotinyl polyethylene glycol 2000] (biotinylated lipids) and 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine are purchased from Avanti polar lipids (Alabaster, AL, USA).

(b) Proteins

(i) Actin

Actin and biotinylated actin are purchased from Cytoskeleton (Denver, CO, USA) and used with no further purification. Fluorescent Alexa-488 actin is obtained from Molecular Probes. Monomeric actin containing 10 or 20% of labelled Alexa-488 actin and 0.25% of biotinylated actin is diluted in G-Buffer (2 mM Tris, 0.2 mM $CaCl_2$, 0.2 mM dithiothreitol (DTT) at pH 8.0).

(ii) Profilin

Wild-type human profilin in pMW expression vector is transformed into Rosetta 2(DE3) pLysS and expressed in 2 l of LB plus antibiotics overnight at 30°C with 1 mM isopropyl thiogalactopyranoside (IPTG). Cells are lysed and sonicated in 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM sucrose, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), 2 M urea and complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), then centrifuged at 100 000*g* for 1 h. Supernatants are collected and bound to DEAE-52 cellulose beads for 1 h. Flow through containing profilin is dialyzed against 20 mM Tris-Cl pH 8.0, 20 mM KCl, 1 mM EDTA and centrifuged for 20 min at 100 000*g*. Supernatants are filtered through a 0.2 μm filter and purified by size exclusion over a HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR column in the dialysis buffer. Profilin is collected and again purified over the Superdex 75 column in the same buffer. Profilin is stored at 4°C.

(iii) His-pWA–streptavidin (S-pVCA)

The In-Fusion (Clontech) cloning method is used to attach human pVCA (verprolin homology central and acidic domain), also called pWA and used in Achard *et al.* [10] and Kawska *et al.* [11], to streptavidin and insert it into pET29 linearized by NcoI/NotI digestion. pVCA is amplified from plasmid pGEX4T1-GST-pWA-His via PCR. The streptavidin gene was a gift of Ahmed El Marjou (Institut Curie). A GSG linker (ggatccgga) is introduced between the pVCA and streptavidin proteins. The resulting pWA–streptavidin is then amplified from the plasmid using a forward oligo that introduces an 8His tag followed by a glycine linker on the 5′ end of the construct and ligated into pET28b(+) via NcoI/NotI digestion. For clone selection, the ligation reaction is transformed into HB101B cells (Invitrogen) to reduce recombination events which pose a problem in this cloning. The construct is transformed into Rosetta 2(DE3) pLysS (Novagen) and expressed in 2 l of LB plus antibiotics, overnight at 20°C with 1 mM IPTG. Cells are lysed and sonicated in 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 40 mM imidazole pH 8.0, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT and complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), then bound to Ni-sepharose high performance beads (GE Healthcare). Unbound proteins are washed away with 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 40 mM imidazole pH 8.0, 1 mM DTT, and bound proteins are eluted in the same buffer containing 300 mM imidazole. Proteins are further purified over the Superdex 200 10/300GL column (GE Healthcare) in 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.5 mM ETDA, 1 mM DTT. Pure protein is dialysed into the same buffer containing 5% glycerol and stored at −80°C. The activity of S-pVCA is checked by a pyrene assay [12] in the presence of the Arp2/3 complex, profilin and actin, and found to be slightly more active than His-pWA (or p-VCA).

(iv) Other proteins

Bovine Arp2/3 complex is purchased from Cytoskeleton and used with no further purification. Mouse capping protein (CP; α_1/β_2) is purified as previously described [13]. Myosin II is purified from rabbit skeletal muscle, and fluorescent myosin II is prepared as previously described [14]. The working buffer contains 25 mM imidazole, 50 mM KCl, 70 mM sucrose, 1 mM Tris, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 0.1 mM DTT, 0.02 mg ml^{-1} casein, adjusted to pH 7.4. All proteins are mixed in the working buffer and myosin II forms minifilaments of approximately 0.7 μm length with about 100 motors [14].

(c) Liposome and actin cortex formation and observations

Liposomes are electroformed [15]. Briefly, 20 μl of a mixture of EPC lipids and 0.1% biotinylated lipids with a concentration of 2.5 mg ml^{-1} in chloroform/methanol 5 : 3 (v : v) are spread on indium tin oxide (ITO)-coated plates under vacuum for 2 h. A chamber is formed using the ITO plates (their conductive sides facing each other) filled with the formation buffer (200 mM sucrose, 2 mM Tris adjusted at pH 7.4) and sealed with haematocrit paste (Vitrex Medical, Denmark). Liposomes are formed by applying an alternate current voltage (10 Hz) for 75 min. Note that osmolarities of the formation buffer and the working buffer are matched. The actin cortex is obtained either by (i) polymerizing the branched actin network directly from the surface through an activator of actin polymerization linked to the membrane or (ii) linking actin filaments directly to the liposome membrane. To induce actin polymerization (i), liposomes are first incubated in 0.1 μM S-pVCA solution and are then diluted 10 times in a mix containing 1 μM monomeric actin containing 10% fluorescent actin monomers and no biotinylated actin monomers, 3 μM profilin, 50 nM of the Arp2/3 complex and various quantities of CP. Actin filaments (F-actin) for linking directly to the membrane in procedure (ii) are obtained by polymerizing, during 1 h, 1 μM or 3 μM of G-actin containing 10% fluorescently labelled G-actin and 0.25% biotinylated G-actin in the presence of phalloidin (1 : 1 ratio with actin monomer concentration). In parallel, liposomes made with biotinylated lipids are incubated with 160 nM of streptavidin for 15 min. To induce F-actin binding on the membrane, biotinylated F-actin is diluted to 0.1 μM and mixed with streptavidin-coated liposomes for 15 min. The mix is diluted 10-fold and flowed into an observation chamber made by heating two Parafilm

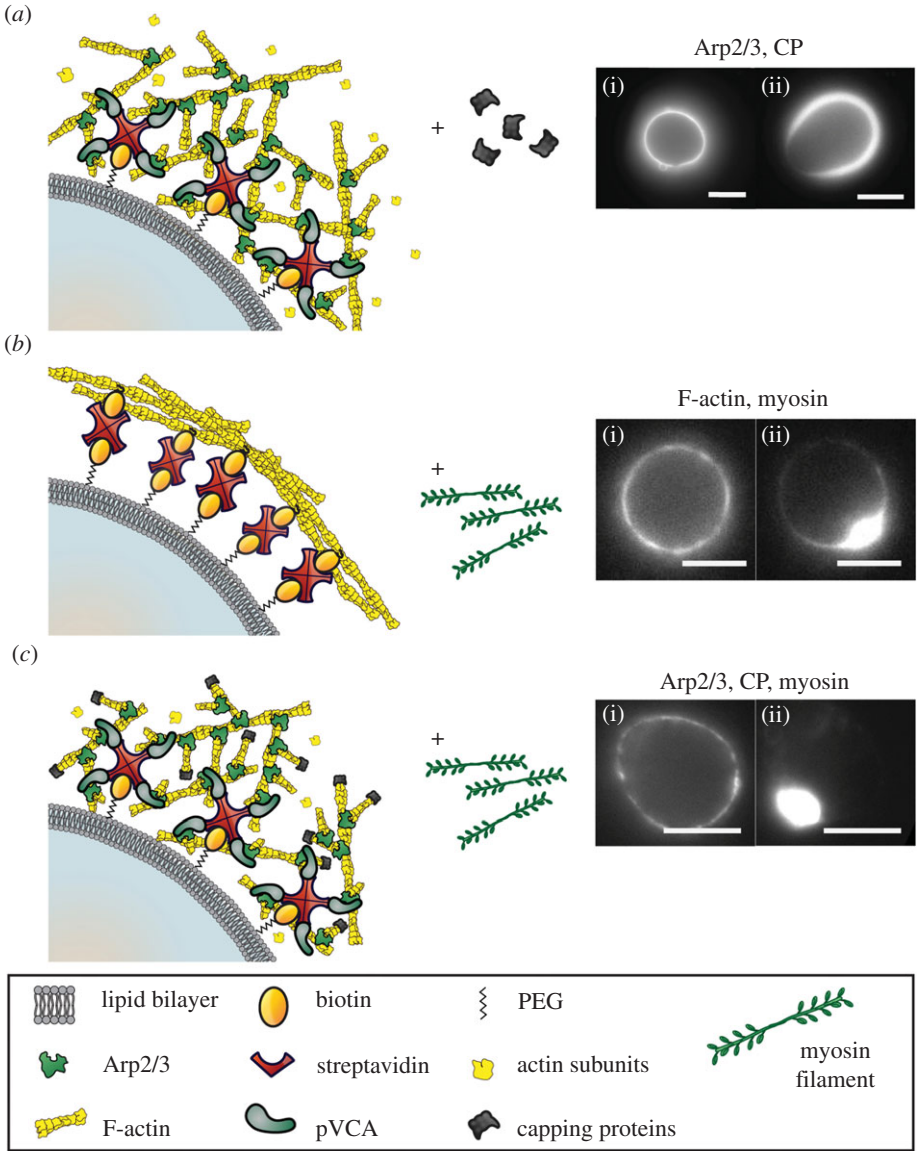


Figure 1. Stress build-up and symmetry breaking of an actin network on a liposome membrane. Left: three different experimental situations schematized (proteins not to scale). Right: epifluorescence images of fluorescently labelled actin. (*a*) Actin filaments are nucleated from a liposome membrane by 50 nM of the Arp2/3 complex in the absence (i) or in the presence (ii) of 20 nM of CP. (*b*) Fluorescently labelled actin filaments (F-actin) are linked to the liposome membrane by a biotin–streptavidin link in the absence (i) or in the presence (ii) of 20 nM myosin II filaments. (*c*) Actin filaments nucleated from a liposome membrane by 50 nM of the Arp2/3 complex in the presence of 10 nM of CP and in the absence (i) or in the presence (ii) of 20 nM of myosin II filaments. Scale bars, 5 μm.

stripes (as spacers) between two coverslips. Five minutes later, after checking that actin-decorated liposomes are observed, myosin II minifilaments are flowed into the chamber. Epifluorescence and phase contrast microscopy are performed using an IX70 Olympus inverted microscope with a 100× or a 60× oil-immersion objective. Spinning disk confocal microscopy is performed on a Nikon Eclipse T1 microscope with an Andor Evolution scan head equipped with an Andor Neo sCMOS camera and using a 60× water immersion objective (NA = 1.20). Imaris ×64 7.4.0 is used for three-dimensional reconstructions with no deconvolution. Randomly chosen liposomes are imaged over time. Intensity profiles are made using Image J. The radius of liposomes carrying actin is measured as the average distance between the liposome centre and the point of maximal intensity.

3. Results

In order to mimic in a controlled fashion the actin cortex next to the plasma membrane, cell-sized liposomes are covered with actin networks to form a shell. We use an 'outside' geometry that allows a perfect control of protein composition and concentrations, although the 'inside' geometry is possible but limited in protein concentration changes that we can apply [16,17]. Two different actin networks are reconstituted at the surface of the liposome membrane that contains biotinylated lipids (figure 1). An actively polymerizing branched network is formed by recruiting the Arp2/3 complex at the membrane via the VCA domain of WASP, which is linked by a streptavidin tag to the membrane, and in the presence of CP (figure 1*a*,*c*). A randomly distributed, non-growing actin filament network is linked to the liposome surface through streptavidin–biotin linkers (figure 1*b*). We observe that each of these conditions leads to the formation of a homogeneous actin shell (i) that becomes heterogeneous (ii) when CP (figure 1*a*) or myosin (figure 1*b*,*c*) is added. When actin continuously polymerizes at the liposome surface (figure 1*a*), stress is accumulated in the network [18]. As described previously, the liposome is able to move after symmetry has broken, and actin appears thinner at the front of the moving liposome, whereas the actin network appears thicker at the rear [19–21]. During movement, actin continues

to polymerize and thus propels the liposome forward through continuous squeezing forces [22,23]. In the two other cases, either actin filaments are already polymerized (figure 1*b*), or the branched network is already formed (figure 1*c*). In these cases, the reorganization of the actin shell relies entirely on the effect of myosin motors, and after contraction has occurred the system does not further evolve. In all cases presented here, symmetry breaks either through actin polymerization or myosin motor forces. Although both mechanisms are at work simultaneously in cells [24], our simplified system allows us to study them separately.

(a) Polymerization of actin induces symmetry breaking depending on capping protein concentration

In order to recruit and activate the Arp2/3 complex to nucleate actin polymerization at the membrane, we use a fragment of WASP, S-pVCA, that is designed to stick to the biotinylated lipids composing the liposome membrane (see Material and methods). Liposomes incubated with S-pVCA are diluted in the working buffer containing the Arp2/3 complex, profilin and CP (see Material and methods) as for branched actin networks grown from polystyrene beads [10,11]. The presence of profilin allows actin branch nucleation to occur mainly at the liposome surface decorated with the S-pVCA and prevents actin filament polymerization in the bulk. Concentrations of the Arp2/3 complex and profilin are kept constant, whereas CP concentration is varied from 0 to 50 nM. In the absence of CP, it has been shown in similar conditions with other systems that actin filaments nucleate by branching at the surface and grow with their barbed ends directed away from the membrane surface [10,11]. In our case, the actin cloud remains homogeneous and symmetry breaking is never observed, because the polymerization force is only used for elongating the filaments homogeneously away from the liposome membrane against the viscous solution (figure 2*a* left, black symbols). When CP is added, the elongation of branched filaments is limited by capping, as can be seen by the decrease of the fluorescence intensity profile outside the liposome that is sharper in the presence of CP than when CP is absent (compare figure 2*a*,*b*). As polymerization continues at the sites of immobilized S-pVCA at the liposome surface, capped branches get pushed away from the surface by the actin filament trees that entangle in a cohesive network [11,25]. At first, the actin network remains homogeneous during this process until liposomes deform and symmetry breaking occurs (elongated shape of liposomes in figure 2*b*,*c*), similar to what is observed around beads [11,18]. Indeed, the cohesive network in the spherical geometry of the liposome is deformed (stretched) during growth and, as a result, a tangential stress develops within the actin shell. This stress is highest on the outside layer and lowest at the liposome surface, where in fact its value is zero because new polymerization occurs at the surface. This stress (a force per unit surface) within the actin shell results in a global tension (a force per unit length) of the actin shell, which is obtained by the integral of the tangential stress over the actin shell thickness. As actin polymerization continues, the tangential stress, and therefore the tension of the shell, increases, until it overcomes a critical stress (or tension) that generates shell breakage. On beads, this tension was clearly demonstrated by photodamaging the actin shell, which consequently broke open by a tension-release mechanism [18]. Note that shell breakage is followed by the expulsion of the liposome from the growing actin shell, creating a propelling comet tail and actin-based motility owing to pushing forces through squeezing stresses, a phenomenon that has been thoroughly studied elsewhere [18,23]. The state of the actin shell is reported on the graphs in figure 2 as a function of the time of observation for different liposome sizes. The separation of the red symbols (symmetry is broken) from the black symbols (symmetry is not broken) represents the symmetry breaking time that is observed to increase in a linear fashion with liposome radius (dashed lines figure 2*b*,*c*), in agreement with previous studies on hard spheres and with a comparable proportionality coefficient of about 0.25–1.5 min μm^{-1} depending on CP concentration [26]. However, in contrast to rigid polystyrene spheres, liposomes allow for the observation of active deformation owing to stress accumulation that typically occurs before the symmetry breaks (figure 2*c*). In the presence of 50 nM CP, actin subnetworks emerging from the Arp2/3 complex are not sufficiently entangled to build up enough tension for symmetry breaking (figure 2*d*). These observations confirm a previous study on hard beads [11] showing that symmetry breaking happens in a concentration window of CP (figure 2*b*,*c*). Altogether, our results show that when branched actin networks are nucleated at a liposome membrane, stress can build up, and generate tension and deformation of the liposome followed by breakage of the shell. This happens if branches are limited in their growth, but long enough to entangle [11].

(b) A preformed actin filament network shell can break symmetry in the presence of myosin motors

In order to investigate how polymerization forces differ from acto-myosin contraction forces, we turn to a non-polymerizing actin network in the presence of myosin motors. Preformed actin filaments with an average length of 4 μm measured by electron microscopy [27] are linked to the membrane via a streptavidin–biotin bond (figure 1*b*) and each actin filament carries an average of four biotins (0.25% biotin–actin label). In the absence of myosin motors, such a system does not build up an intrinsic stress, as we never observe any liposome deformation and symmetry breaking. Upon myosin II injection in the chamber, the shell breaks open (figure 3*a*). The time at which the symmetry breaking happens does not depend on the liposome radius (figure 3*b*). The volume of the liposomes is observed by filling them with 0.9 μM of sulforhodamine B, a red fluorescent dye (figure 3*c*). The volume of the liposome (red) and the actin shell (green) can be observed simultaneously by spinning disk confocal microscopy (figure 3*c*,*d*). Symmetry breaks in a 'peeling' process, where the actin shell first deforms the liposome then contracts on one side. To highlight where the deformation occurs around the liposome, we subtract two images of the equatorial section of the liposome volume (red channel, before and after deformation) and take the absolute value of the subtracted intensity. This treatment results in a map of the liposome contour (10-pixel thickness) deformations (figure 3*d*). If the liposome is not deformed then the variation of intensity is low, whereas under liposome deformation the variation of intensity is high (figure 3*d*, lower panel). The time at which the peeling contraction starts depends on myosin concentration and decreases from about 17 min to 3 min for myosin concentrations of 2 and 200 nM, respectively [27]. Strikingly, the duration of contraction and the speed of

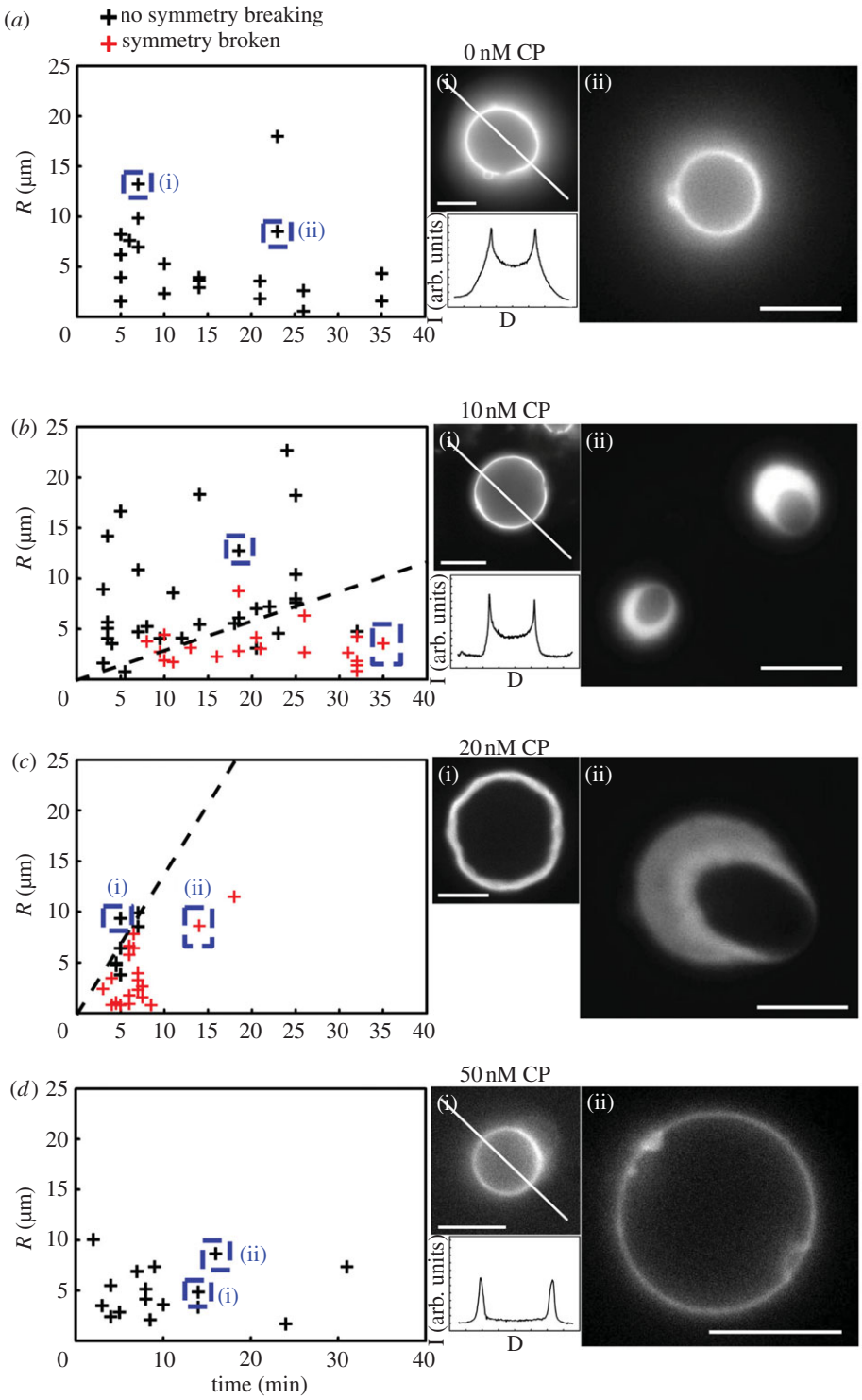


Figure 2. Polymerization of a branched actin network around cell-sized liposomes membranes can induce stress build-up and symmetry breaking. (*a*,*b*,*d*) Epi-fluorescence images (i) and (ii). (*c*) Spinning disk confocal microscopy images (i) and (ii). (*a*–*d*) Time zero corresponds to the start of the polymerization of 1 μM actin in the presence of 50 nM Arp2/3, 3 μM profilin and the indicated concentration of CP. The sizes of the observed liposomes over time are plotted for each concentration of CP as red symbols if the symmetry has already broken or black symbols if the shell appears homogeneous. The black dashed line indicates the border between broken or not broken actin shells. The symbols surrounded by a blue dashed rectangle are the liposomes represented in (i) and (ii) as examples of non-symmetry broken and symmetry broken liposomes. Below (i) is the corresponding intensity profile over the distance D along the white line in (i), except for the spinning disk images in (*c*). Scale bars, 10 μm. Between 20 and 50 liposomes were observed in each condition.

retraction (peeling) are independent of myosin concentration [27] and of the order of 1 min for the duration and about $14 + 6\ \mu\text{m min}^{-1}$ for the retraction speed in a 2–200 nM myosin concentration range (figure 3*a*,*c*). The constant peeling duration when myosin concentration is varied indicates that the peeling mechanism is independent of myosin activity and indicates a purely elastic relaxation mechanism. However, the time at which peeling starts does decrease when myosin concentration is increased, indicating that a sufficient quantity of myosin motors needs to be present for peeling to start.

(c) Contractility of a branched actin network in the presence of myosin

In order to go one step further in the reconstruction of the contractility of a cell cortex, we combine the two approaches

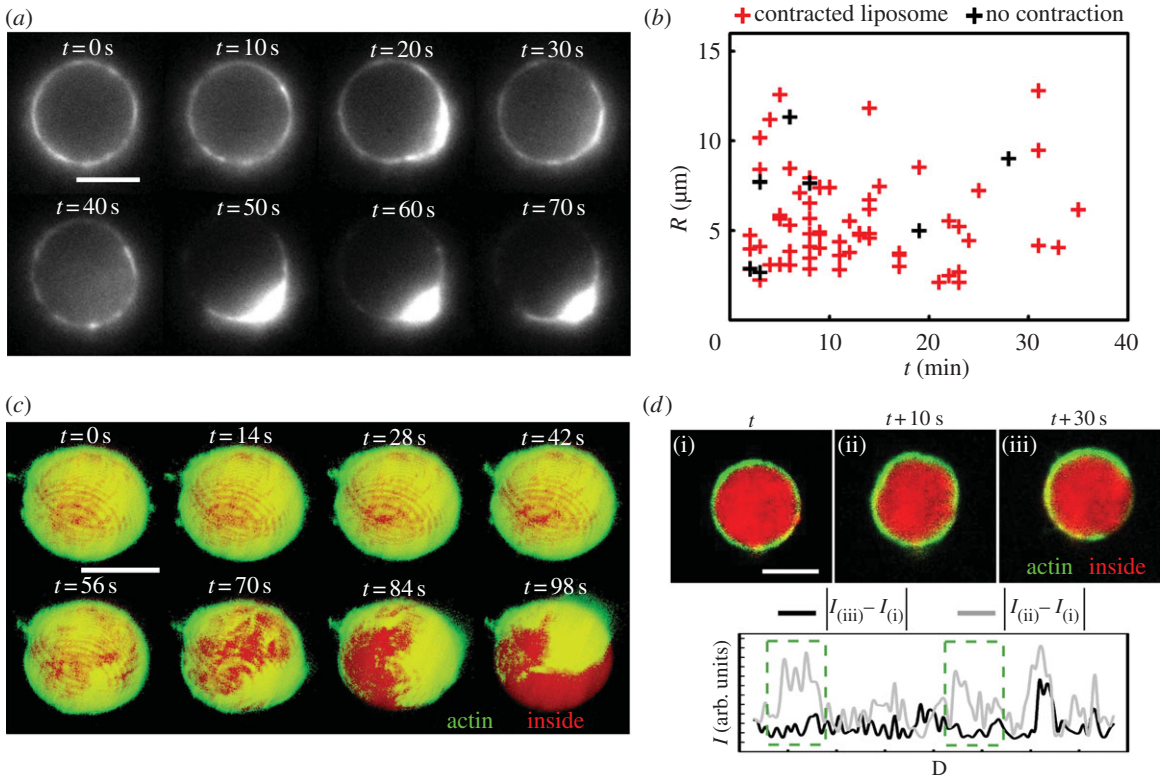


Figure 3. Acto-myosin contraction of fluorescent actin filaments organized into a shell. Time-lapse images in epifluorescence (*a*) and spinning confocal microscopy (*c*,*d*). Time (*t*) indicated in white. (*a*) Contraction of an actin shell after injection of 20 nM myosin II minifilaments in the observation chamber. (*b*) Size of contracted and uncontracted liposomes over time; time zero corresponds to the injection of myosin II minifilaments. Symbols mark the state, contracted in red or not in black, of the liposome (78 liposomes). (*c*) Time lapse of three-dimensional reconstruction with actin (green) and inside solution (red); time zero corresponds to the start of the contraction. (*d*) Time lapse of a spinning disk confocal slice at the equatorial plane of the liposome with actin (green) and inside solution (red): (i) before contraction, (ii) just before actin distribution becomes heterogeneous, and (iii) when the actin network ruptures. Below each image is the absolute value of the intensity difference in the red channel over the distance D along the contour of the liposome: black curve, difference of (iii) and (i); grey curve, difference of (ii) and (i). Green dotted boxes show the regions of high variation in intensity corresponding to the most deformed regions. Scale bar, 5 μm.

described above to produce a branched actin network contracted by myosin motors. This is physiologically relevant as the Arp2/3 complex has been shown to participate in the construction of the acto-myosin network in cells [8] and its properties have been studied *in vitro* [28]. We choose conditions where the stress owing to actin polymerization and branching is not high enough to break the symmetry (0 and 50 nM CP; figure 2*a*,*d*) or where the symmetry breaks later than the time at which we inject myosin (10 nM CP; figure 2*b*). We want to address here if and how a branched network is able to contract in the presence of myosin II motors and, in particular, the role of filament length. For that, we vary the concentration of CP when forming the actin shell. In the absence of CP, when myosin motors are added, no contraction happens (figure 4*a*). In the absence of CP, there are two kinds of coexisting networks: the branched network at the vicinity of the membrane where the Arp2/3 complex is activated by S-pVCA, and long parallel filaments coming out of the branched network and elongating with their barbed ends far away from the membrane [10]. As myosin motors move toward the barbed end and are unable to contract parallel actin filaments, they may not reach the branched filaments that lie on the two-dimensional plane of the membrane in our 20 min observation window, consistent with observations on patterned substrates [28]. In the presence of 10 nM CP, contraction is observed and the actin shell is peeled away similar to the situation of figure 3 and aggregates together with myosin motors on one side of the liposome (figure 4*b*). Increasing the CP concentration to 50 nM leads to the loss of actin rearrangement even if myosin is observed to interact with the actin network (figure 4*c*). In this case, there is no contraction and no symmetry breaking as actin subnetworks form a loosely entangled actin network unable to sustain tension and to accumulate stress. Myosin is generally thought to work on linear filaments, but here we show clearly that branched networks, nucleated by 50 nM of Arp2/3 complex, contract in the presence of myosin II minifilaments in a CP concentration window of 10–20 nM (figure 4*d*).

4. Discussion

Initiation of cell polarization is difficult to study in cells because it is a complex, multi-scale phenomenon downstream of signalling events and leading to cell-scale deformation. Our controlled system gives an alternative way of studying fundamental biochemical and physical mechanisms triggering contraction and polarization induced by myosin II and actin polymerization dynamics.

(a) Stress build-up can arise from different mechanisms

We show that tension can build up around a liposome, generated either by pure actin polymerization stresses or by pulling forces of myosin motors. The tension increase in the network is due to either actin dynamics only or the action of molecular motors that slide actin filaments relative to each other, creating strain that results in stress. In both cases, we observe that the liposome deforms prior to symmetry breaking (figures 2*c* and 3*d*). This indicates that even though the intrinsic tension

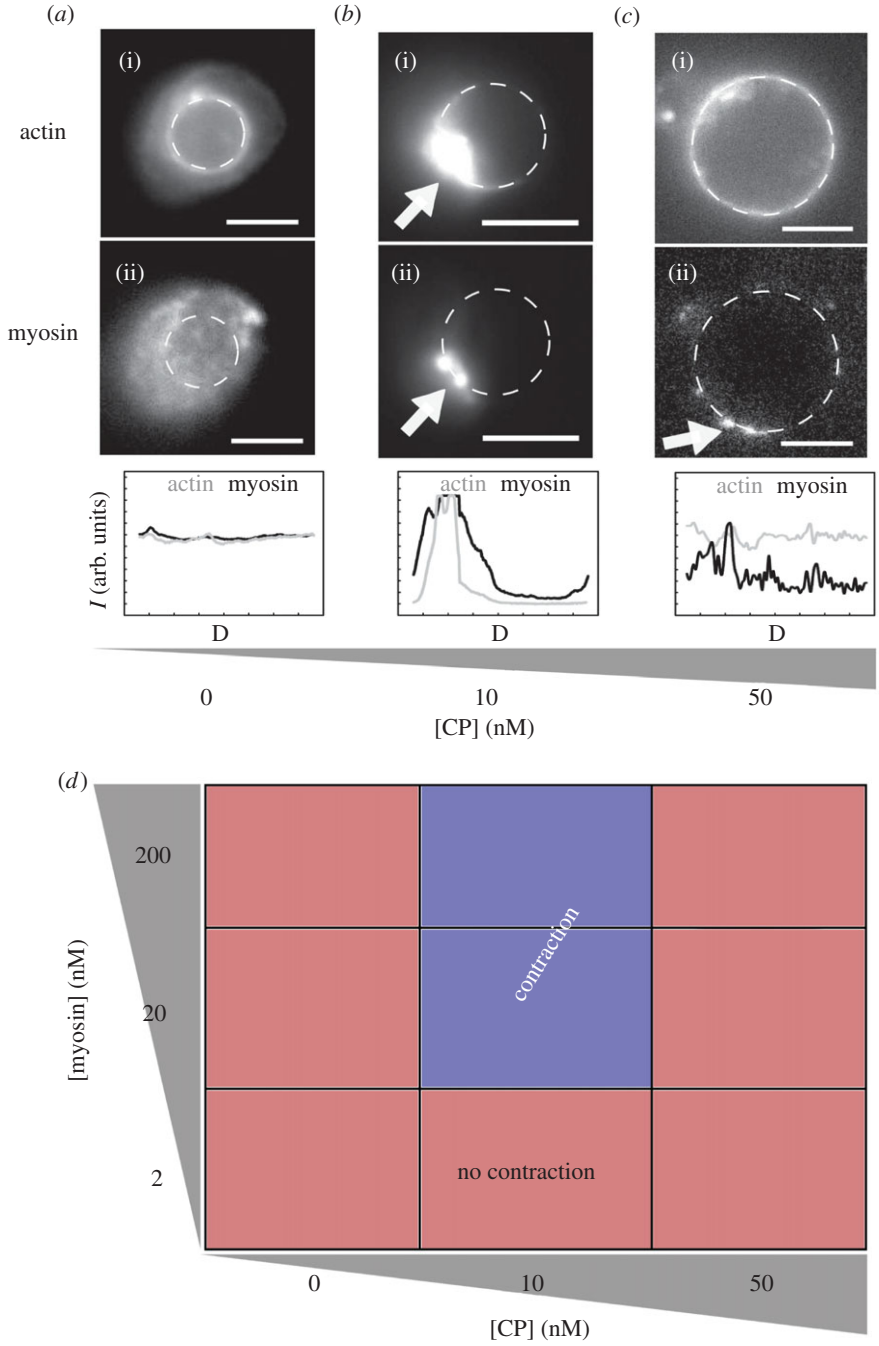


Figure 4. Contraction of branched actin networks by myosin II. (*a*–*c*) Epifluorescence images of (i) actin and (ii) myosin II, for different CP concentrations as indicated. The position of the liposome is given by the white dashed line, and the corresponding intensity profiles over the distance D along the contour for actin channel and myosin channel are given below the images (actin in grey, myosin in black). (*d*) Diagram of contraction as a function of myosin and CP concentration. Scale bar, 5 μm.

is not yet high enough to rupture the network and trigger polarization, it can deform the membrane.

We are able here to distinguish the tension induced by actin polymerization from the tension induced by myosin motors. When actin polymerizes, the symmetry breaking time depends on the size of the liposome (figure 2) and the velocity of polymerization [29], whereas it does not depend on liposome size when the tension is myosin induced (figure 3). In myosin-contracting shells, the time for symmetry to break is governed by the number of myosin motors able to interact with the actin network (figures 2*b* and 3*b*).

Polymerization forces generate a tangential stress in the actin network that is maximal on the outer layer of the shell. The integral of the tangential stress over the thickness of the actin gel results in a tension. When this tension is higher than a threshold for rupture of the actin network, the shell breaks and relaxes tension. This threshold tension depends on the radius of the liposome and decreases when the liposome radius increases, explaining why larger liposomes break symmetry more slowly (figure 2*b*,*c*). Likewise, myosin contraction forces generate tension in the actin shell that is able to break when the threshold in myosin motor number, and therefore tension, is exceeded. In both cases, polymerization forces or contractile forces by myosin motors, this threshold tension is increased in the presence of cross-linkers that reinforce the actin network making it more difficult to break [18,27]. In the case of a branched actin network put under tension by myosin motors, the formation of a hole or a crack may be facilitated by depolymerization under contraction, a phenomenon shown

in vitro in a different geometry [28] and shown in cells where motors disassemble the actin network at the rear of motile cells or at the back of the lamellipodium [29]. Once a hole has opened in the actin shell, the network retracts through an elastic relaxation, like the release of a stretched rubber band. In the case of polymerization forces, the continuously growing actin network can propel the liposome by squeezing forces as the network is continuously generating stresses [19,21,22]. When myosin-generated tension has relaxed, no further contraction or movement is observed in the case of figures 3 and 4.

In all cases, the morphology of the network and the lengths of filaments or branches are crucial to achieve contraction (figure 4). Indeed, without CP, the actin filaments are long and organized in a parallel fashion away from the surface. In this case, the polarity of actin filaments is such that myosin filaments actively move outward, which prevents the motor from entering into the branched network at the vicinity of the membrane (figure 4*a*). In the presence of CP, myosin is able to contract the branched network. It is important to note that the concentration window of CP in which we obtain myosin-induced contraction is similar to the one where symmetry breaking is observed with polymerizing networks (figures 2 and 4) [11].

5. Conclusion

We reproduce an actin cortex around a liposome membrane and show that intrinsic tension build-up arises from two distinct mechanisms: active polymerization and myosin II motor activity. Spontaneous polarization of the system is due to accumulated stress that reaches the critical stress needed to break the network. In the case of branched actin networks either with or without myosin, the main regulator of polarization is CP, which regulates the length of actin filaments. Extrapolating our work to the context of the cell, forces in cells can be generated by two different mechanisms, based either on pure actin polymerization or on pure myosin contraction. The density of the actin network and especially the length of the actin filaments in the network might be a crucial element for controlling contraction and polarization. Note that cortical flows in cells have both polymerization and motor mechanisms at work, as actin constantly polymerizes at the cell membrane, whereas acto-myosin contraction squeezes the cortex and presumably enhances actin disassembly for actin turn-over. Our work paves the way for a reconstitution of both active systems at the same membrane.

Acknowledgements. We thank G.H. Koenderink and F.C. Tsai for teaching us the purification of myosin II minifilaments. We acknowledge Dr Agnieszka Kawska at IlluScientia.com for the graphical representation of figure 1.

Funding statement. This work was supported by the French ANR grant nos. ANR 09BLAN0283, ANR 12BSV5001401 and ANR-11-JSV5-0002, and by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) grant no. DEQ20120323737. K.C. was supported by a post doc fellowship from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and J.L. by doctoral fellowship from AXA research fund.

References

1. Levayer R, Lecuit T. 2012 Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics. *Trends Cell Biol.* **22**, 61–81. (doi:10.1016/j.tcb.2011.10.001)
2. Salbreux G, Charras G, Paluch E. 2012 Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends Cell Biol.* **22**, 536–545. (doi:10.1016/j.tcb.2012.07.001)
3. Hawkins RJ, Poincloux R, Bénichou O, Piel M, Chavrier P, Voituriez R. 2011 Spontaneous contractility-mediated cortical flow generates cell migration in three-dimensional environments. *Biophys. J.* **101**, 1041–1045. (doi:10.1016/j.bpj.2011.07.038)
4. Sedzinski J, Biro M, Oswald A, Tinevez J-Y, Salbreux G, Paluch E. 2011 Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature* **476**, 462–466. (doi:10.1038/nature10286)
5. Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai RS, Ike H, Yuasa S, Usukura J, Kusumi A. 2006 Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* **174**, 851–862. (doi:10.1083/jcb.200606007)
6. Tinevez J-Y, Schulze U, Salbreux G, Roensch J, Joanny J-F, Paluch E. 2009 Role of cortical tension in bleb growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 18 581–18 586. (doi:10.1073/pnas.0903353106)
7. Paluch E, Piel M, Prost J, Bornens M, Sykes C. 2005 Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments. *Biophys. J.* **89**, 724–733. (doi:10.1529/biophysj.105.060590)
8. Fritzsche M, Lewalle A, Duke T, Kruse K, Charras G. 2013 Analysis of turnover dynamics of the submembranous actin cortex. *Mol. Biol. Cell.* **24**, 757–767. (doi:10.1091/mbc.E12-06-0485)
9. Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME, Pollard TD. 1999 Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 3739–3744. (doi:10.1073/pnas.96.7.3739)
10. Achard V, Martiel J-L, Michelot A, Guérin C, Reymann A-C, Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R. 2010 A primer-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* **20**, 423–428. (doi:10.1016/j.cub.2009.12.056)
11. Kawska A, Carvalho K, Manzi J, Boujemaa-Paterski R, Blanchoin L, Martiel J-L, Sykes C. 2012 How actin network dynamics control the onset of actin-based motility. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 14 440–14 445. (doi:10.1073/pnas.1117096109)
12. Cooper JA, Walker SB, Pollard TD. 1983 Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **4**, 253–262. (doi:10.1007/BF00712034)
13. Soeno Y, Abe H, Kimura S, Maruyama K, Obinata T. 1998 Generation of functional beta-actinin (CapZ) in an *E. coli* expression system. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **19**, 639–646. (doi:10.1023/A:1005329114263)
14. Silva MSE, Depken M, Stuhrmann B, Korsten M, Mackintosh FC, Koenderink GH. 2011 Active multistage coarsening of actin networks driven by myosin motors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 9408–9413. (doi:10.1073/pnas.1016616108)
15. Angelova M, Dimitrov D. 1986 Liposome electroformation. *Faraday Discuss.* **81**, 303. (doi:10.1039/dc9868100303)
16. Pontani L-L, Van der Gucht J, Salbreux G, Heuvingh J, Joanny J-F, Sykes C. 2009 Reconstitution of an actin cortex inside a liposome. *Biophys. J.* **96**, 192–198. (doi:10.1016/j.bpj.2008.09.029)
17. Tsai F-C, Stuhrmann B, Koenderink GH. 2011 Encapsulation of active cytoskeletal protein networks in cell-sized liposomes. *Langmuir* **27**, 10 061–10 071. (doi:10.1021/la201604z)
18. Van der Gucht J, Paluch E, Plastino J, Sykes C. 2005 Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 7847–7852. (doi:10.1073/pnas.0502121102)
19. Giardini PA, Fletcher DA, Theriot JA. 2003 Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 6493–6498. (doi:10.1073/pnas.1031670100)
20. Heuvingh J, Franco M, Chavrier P, Sykes C. 2007 ARF1-mediated actin polymerization produces

movement of artificial vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 16 928–16 933. (doi:10.1073/pnas.0704749104)

21. Van Oudenaarden A, Theriot JA. 1999 Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility. *Nat. Cell Biol.* **1**, 493–499. (doi:10.1038/70281)
22. Boukellal H, Campás O, Joanny J-F, Prost J, Sykes C. 2004 Soft Listeria: actin-based propulsion of liquid drops. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys.* **69**, 061906. (doi:10.1103/PhysRevE.69.061906)
23. Plastino J, Sykes C. 2005 The actin slingshot. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 62–66. (doi:10.1016/j.ceb.2004.12.001)
24. Bray D, White JG. 1988 Cortical flow in animal cells. *Science* **239**, 883–888. (doi:10.1126/science.3277283)
25. Sykes C, Plastino J. 2010 Cell biology: actin filaments up against a wall. *Nature* **464**, 365–366. (doi:10.1038/464365a)
26. Bernheim-Groswasser A, Wiesner S, Golsteyn RM, Carlier M-F, Sykes C. 2002 The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* **417**, 308–311. (doi:10.1038/417308a)
27. Carvalho K, Tsai F-C, Lees E, Voituriez R, Koenderink GH, Sykes C. Submitted. Cell sized liposomes reveal how acto-myosin cortical tension drives shape change.
28. Reymann A-C, Boujemaa-Paterski R, Martiel J-L, Guérin C, Cao W, Chin HF, De La Cruz EM, Théry M, Blanchoin L. 2012 Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science* **336**, 1310–1314. (doi:10.1126/science.1221708)
29. Wilson CA *et al*. 2010 Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature* **465**, 373–377. (doi:10.1038/nature08994)

5.5 Article 4 : Cell-sized liposome doublets reveal active cortical tension build up.

Joël Lemière, Matthias Bussonier, Timo Betz, Cécile Sykes et Kevin Carvalho

Article en préparation

Cell-sized liposome doublets reveal active cortical tension build up

Joël Lemière[a,b,c,d], Matthias Bussonnier[a,b,c,d], Timo Betz[a,b,c], Cécile Sykes[a,b,c] & Kevin Carvalho[a,b,c]

[a] Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, F-75248 France

[b] CNRS, UMR 168, Paris, F-75248 France

[c] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 168, F-75005, Paris, France

[d] Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75205 Paris, France

Abstract

Cells are able to generate contractile forces and modulate their shape to fulfill their specific functions. The cell cortex, a thin actin shell bound to the plasma membrane, mediates these essential behaviours. It is the substrate for myosin activity which builds up cortical tension, although actin dynamics may also contribute as observed by mechanical manipulation of cells. Here, we dissect the sole effect of myosin II on cortical tension increase with a non-invasive method. Cell-sized biomimetic liposomes are arranged in doublets and covered with a stabilized actin cortex anchored to the membrane. The addition of myosin II minifilaments to this doublet triggers a shape change unambiguously related to cortical tension increase. Our assay paves the way for a quantification of cortical tension changes triggered by various actin-associated proteins in a cell-sized system.

Introduction

Cells are highly dynamic and need to change their shape in almost all cellular events spanning from division and motility to tissue remodeling. One of the major components involved in these processes is the contractile actin cytoskeleton arranged in a sub-micrometer thick network linked to the plasma membrane and called the acto-myosin cortex [1]. It drives cell shape changes and polarization [2] and governs tissue remodeling [3]–[6]. This cortex insures tension in cells, called cortical tension [7]–[9]. Plasma membrane and myosins are the essential modulators for this tension. Micromanipulation of cells allows to measure this cortical tension, which is between 50 and 4000 pN/µm depending on cell type, myosin activity and actin dynamics [7], [10]–[12]. Moreover, as shown with cell doublets, cell-cell adhesion is able to modulate cortical tension [13], a mechanism that is involved in cell sorting in tissue formation [14]. Recently, acto-myosin cortices have been reconstructed on supported lipid bilayers [15], on cell-sized liposomes [16] and those reconstructions allowed to understand how crosslinking, attachment to the membrane, and actin filament length influence contraction by myosin activity and actin polymerization [17].

In this study, we determine cortical tension increase by the use of cell-sized doublet liposomes around which an acto-myosin cortex is reproduced *in vitro*. Cortical tension change is quantified by analyzing doublet shape change. This approach is reminiscent of cell-cell doublets used to uncover the role of cell adhesion in cortical tension change [14]. Our assay allows isolating the role of myosin motors on cortical tension build up, independently of actin dynamics and membrane tension.

Results

Formation of liposome doublets

Liposomes are obtained by electroformation [18] from a mixture of egg-phosphatidylcholine (EPC) and biotin-PEG lipids (**See Material and methods**). We take the advantage of biotin PEG lipids to stick liposomes together by adding streptavidin in the liposome solution (**see MM**). In these conditions, several doublets are formed within 15 minutes (**Fig 1A**).

Attachment of actin on doublet liposomes

Phalloidin-stabilized fluorescent actin filaments, obtained in the presence of biotinylated actin monomers, stick to the membrane of the doublets through a biotin-streptavidin-biotin link (**Fig 1B**) and form a crosslinked homogeneous coat, as already characterized on liposomes [16]. Note that the interface between the two liposomes is free of actin filaments (**Fig 1C - i**). To avoid the use of fluorescent lipids that may affect membrane mechanics [19], this interface is visualized by fluorescently labeling the inside buffer with 0.9 μM of sulforhodamin B (SRB) of only one of the liposomes (**see MM and Fig 1C - i**).

Effect of myosin injection

Myosin II motors, which assemble into bipolar filaments, are injected in the observation chamber by exchanging the external solution using an H-shaped flow chamber where doublets are imaged (**Fig 1C - ii**). Myosin II motors trigger a shape change of the doublets within minutes (**Fig 1C - iii**) and geometrical characteristics of the liposome doublets are modified: the distance between liposome centers (d), the radii R_1 and R_2 of the liposomes 1 and 2, respectively (R_1>R_2), the radius of curvature

of the interface R_i, the volume of the doublet V, θ_1 and θ_2 , the angles between the interface and the liposome 1 or 2, respectively. We define the total contact angle $\theta_{tot}=\theta_1+\theta_2$ (**Fig 1D**). These parameters are geometrically linked (**Fig 1D**), and obtained by adjusting two spherical caps in contact, either in 2D- (phase contrast and epifluorescence) or 3D- (spinning disk) images (**see MM**). We use the total contact angle θ_{tot} as a reporter for shape change. We find that myosin addition produces an increase of θ_{tot}. Indeed, on epifluorescence images and in the absence of myosin, we measure a total contact angle θ_{tot} of (64 $\pm$ 16)° (n=18) whereas in the presence of 200 nM myosin and before the actin cortex ruptures, we find a θ_{tot} value of (86 $\pm$ 21)° (n=5).

Angles are related to tensions

Liposomes 1 and 2 have a uniform tension τ_1 and τ_2, respectively. Tension refers to the sole membrane tension In the absence of actin and myosin, and to cortical tension in the presence of actin and myosin. The tension at the interface between liposome 1 and 2 has two components: a membrane tension τ_i and the adhesion energy per unit surface *W* which is due to biotin-streptavidin-biotin adhesion, and reads $(\tau_i - W)$. The Young's equation, which relates tensions and angles, can be applied to the contact line between the two doublet liposomes (**Fig1 D**). When projected on the contact surface tangent, the Young's equation reads:

$$\tau_i - W = \tau_1 \cos\theta_1 + \tau_2 \cos\theta_2 \qquad \textbf{\textit{(1)}}$$

When projected orthogonally to the contact surface tangent, one finds:

$$\tau_1 \sin\theta_1 = \tau_2 \sin\theta_2 \quad \textbf{\textit{(2)}}$$

Contact angle dispersion

Dispersion in θ_{tot} before myosin injection reflects a difference in tension, which could be due either to the dispersion of tension during the liposome preparation, to a difference in adhesion at the interface between doublet liposomes, or to contribution of the actin shell in tension build up. The dispersion in contact angle is on the same order of the increase in total angle we observe in the presence of myosin. Thus, to avoid this effect of dispersion, we follow the evolution of θ_{tot} on the same doublet.

The sole presence of an actin shell does not modify the contact angle

We now investigate how the actin shell affects the contact angle, and thus the tension, in the absence of myosin. We compare the shape of the same doublet in the presence or in the absence of an actin shell by photo-damaging the actin filamentous network **(Fig 2A**) [20]. The total contact angle changes by (3.4 $\pm$ 2)° (n = 7) whereas the volume V of the doublet does not change once the actin shell is disrupted **(Fig 2B**). We conclude that the change of θ_{tot} observed when the actin shell is disrupted is small and negligible compared to the one due to myosin activity.

3D observations

Since liposomes have a size with the ratio R_1/R_2 that varies between 1.15 and 1.82, the plane of epifluorescence images is generally not parallel to the doublet equatorial plane, leading to an underestimate of the angle. Therefore, 3D spinning disk images are recorded (**Fig 3A**) for an accurate determination of θ_{tot}, of the volume of the doublet V, of the distance between liposome centers d which are obtained (**Fig 3B, C, D**) by fitting spherical caps on 3D stacks (**see mat and meth**). All values are noted θ_{tot}^{I}, V^{I}, d^{I} before myosin addition and $\theta_{tot}(t)$, V(t), d(t) after addition of myosin at

t=0. We observe that θ_{tot} (t) increases, whereas d(t) decreases when myosin filaments are flood in the chamber. During this process, the volume remains constant within 10% consistent with cell doublet experiments [14], [21] (**Fig 3D**).

The interface between liposome 1 and 2 is only a small portion of a sphere, with its curvature $1/R_i$ (**Fig 1D**) that is much smaller than $1/R_1$ and $1/R_2$ within optical resolution (**Fig SI**). Therefore, a precise estimate of the radius R_i is not possible. However, by visual inspection of our images, we find that this interface, in the absence of myosin, only differs from a flat interface by a few pixels. Also, there is no drastic size dissymmetry of the liposomes composing doublets. In these conditions, we can assume that $\theta_1 = \theta_2 = \theta$ within our resolution.

Discussion

Cortical tension is homogeneous for a single doublet

The use of **equation (2)** with $\theta_1(t) = \theta_2(t) = \theta_{tot}(t)/2$ leads to the equality of tensions on both sides of the doublet, thus, $\tau_1(t) = \tau_2(t) = \tau(t)$. This result is consistent with the fact that actin is distributed continuously all around the liposome doublet. Thus, myosin II mini-filaments pull on a continuous shell. In these conditions, **equation (1)** simplifies into:

$$\tau_i - W = 2\tau(t).\cos\theta(t) \qquad \textbf{\textit{(3)}}$$

Where $\theta(t) = \frac{\theta_{tot}(t)}{2}$ and with a reasonable assumption that $\tau_i - W$ may depend on the variability of initial adhesion in our experiments, but considered as constant over time for a given doublet. Therefore, we obtain an expression of the tension $\tau(t)$ that varies during acto-myosin contraction and reads

$$\tau(t) = \frac{cst}{2.\cos\theta(t)} \qquad \textbf{(4)}$$

Hence, we evaluate the tension relative to its initial and over time, which leads with our notations to:

$$\frac{\tau(t)}{\tau^I} = \frac{\cos\theta^I}{\cos\theta(t)} \qquad \textbf{(5)}$$

Relative increase of cortical tension

Interaction of myosin II filaments with a biomimetic actin cortex induces tension build up. The cortical tension normalized to its initial value, $\frac{\tau(t)}{\tau^I}$ increases and reaches a plateau where $\tau(t) = \tau^P$ (**Fig 3E**) with the same trend as $\theta_{tot}(t)$. Note that if the actomyosin shell breaks and peels, the doublet recovers its initial shape (**see dashed blue line for d and θ Fig3**). The average relative tension is found to be $\frac{\tau^P}{\tau^I}$ = 1.56 ± 0.56 (n=5) in 3D and $\frac{\tau^P}{\tau^I}$ = 1.25 ± 0.15 (n=5) in epifluorescence, in agreement with the underestimates of the contact angle in epifluorescence (see above).

Cortical tension increase in doublets and in cells

In cells, cortical tension can be as low as 50 pN/µm in fibroblast progenitor cells [10] and can go up to 4000 pN/µm for dictyostelium [11]. Surprisingly, when myosin activity is affected, either by drugs or by genetic manipulation the cortical tension only decreases by a factor of about 2 [7], [10], [11], [22]. Our *in vitro* reconstruction is able to capture this feature in the change of cortical tension. Indeed, we observe a cortical tension of the doublets increasing by a factor 1.1 to 2.4.

Different contributions for cortical tension

Cortical tension is the sum of the membrane tension and the tension due to the actomyosin cortex. In our assay, membrane contributes for about 50% of the cortical tension. In suspended fibroblast cells however, membrane tension is estimated to be 10% of the cortical tension [7]. Therefore, this difference can be explained by actin dynamics, which is prevented in our assay. Actin dynamics is confirmed to have a role on cortical tension that is multiplied by a factor of 5 when polymerization of actin is stimulated [7], [13]. How actin polymerization contributes to cortical tension is still an open question that needs to be addressed in the cell geometry. Whereas actin polymerization outside a liposome has been clearly shown to generate inward pressure, how this can be translated into tension in a different geometry is not yet clear. *In vitro* assays are on their way to mimic actin dynamics in cells [23], [24] and will allow unveiling the mechanism of tension build up by actin dynamics, which is the remaining module that needs to be understood, the effect of myosin and the one of the membrane being clarified in this study.

Conclusion

We provide a biomimetic reconstitution of tension build up through acto-myosin contractility using liposome doublets. Cortical tension change is visualized *in situ* over time by analyzing doublet shape changes. This method allows us to directly quantify the relative increase in tension due to myosin, separately from the one due to actin dynamics. Understanding contraction of composite systems built brick by brick on the model of a cell tile the road for the reconstitution of complex systems like tissues.

Acknowledgments: This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR), grant ANR 09BLAN0283 and ANR 12BSV5001401, and by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), grant DEQ20120323737. We thank Dr Agnieska Kawska at IlluScientia for schemes. JL and MB thank the AXA Research Fund for doctoral fellowships. JL and KC were supported by la Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. We thank Thomas Risler and Clément Campillo for critical reading of the manuscript

Material and methods.

Lipids, reagents and proteins. Chemicals are purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless specified otherwise. L-alpha-phosphatidylcholine (EPC) and 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl polyethylene glycol 2000] (biotinylated lipids), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine are purchased from Avanti polar lipids (Alabaster, USA). Actin and biotinylated actin are purchased from Cytoskeleton (Denver, USA) and used with no further purification. Fluorescent Alexa-488 actin is obtained from Molecular Probes. Monomeric actin containing 10% or 20% of labeled Alexa-488 actin and 0.25 % of biotinylated actin is diluted in G-Buffer (2mM Tris, 0.2mM $CaCl_2$, 0.2mM DTT at pH 8.0). Myosin II is purified from rabbit skeletal muscle and fluorescent myosin II is prepared as previously described [25] and its functionality is confirmed by motility assays showing an average gliding speed of 4.5 $\pm$ 1.5 µm/s (N = 27) [26]. The working buffer contains 25 mM imidazole, 50 mM KCl, 70 mM sucrose, 1mM Tris, 2 mM MgCl2, 1 mM ATP, 0.1 mM DTT, 0.02 mg/ml β-casein, adjusted to pH 7.4. All proteins are mixed in the working buffer and myosin II forms minifilaments of approximately 0.7 micrometer length with about 100 motors [27].

Formation of liposome doublets, actin cortices on doublets. Liposomes are electroformed [18]. Briefly, 20 µL of a mixture of EPC lipids and biotin PEG lipids present at 0.1 mole % with a concentration of 2.5 mg/ml in chloroform/methanol 5:3 (v:v) are spread on ITO-coated plates and dried under nitrogen flow, then placed under vacuum for 2 hours. A chamber is formed using the ITO plates (their conductive sides facing each other) filled with sucrose buffer (200mM sucrose, 2mM Tris adjusted at pH 7.4), and sealed with hematocrit paste (Vitrex medical, Denmark). Liposomes are formed by applying an alternate current voltage (1V - 10 Hz) for 1hour and 15 minutes. Then liposomes are incubated with 160 nM streptavidin for 15 min and diluted 30 times. At this stage we have doublets coated with streptavidin. Waiting more than 15 min will increase the quantity of liposome aggregates and decrease the quantity of doublets and single liposomes. A bulk solution of 40 µM actin monomers (Cytoskeleton, Denver USA) containing 10% fluorescently labeled actin and 1/400 biotinylated actin monomers is polymerized at 1 µM by diluting 40 times in the working buffer (25 mM imidazole, 50 mM KCl, 70 mM sucrose, 1mM Tris, 2 mM MgCl2, 1 mM ATP, 0.1 mM DTT, 0.02 mg/ml β-casein, adjusted at a pH 7.4) for 1 hour in the presence of 1 µM of phalloidin (to prevent depolymerization). Actin filaments are then diluted 10-fold to 0.1 µM, mixed with streptavidin-coated doublets of liposomes, and incubated for 15 min. The mix is diluted 5 times for observation to reduce background fluorescence from actin filaments.

Observation chamber design, formation and myosin II injection. Observation chambers are made by heating Parafilm stripes (as spacer) with an H-shape between two coverslips. The solution containing doublets is injected in the chamber and let few minutes in order to let the doublets sediment (**Fig 1C**). Then myosin II filaments are injected in the chamber and the H-shape and doublets are imaged over time in

the middle of the chamber (**Fig 1C**). Conditions (streptavidin, actin filament length) are the same as in [16] but observations are made before symmetry breaking of the acto-myosin shell.

Observation of doublets. Epifluorescence and phase contrast microscopy are performed using an IX70 Olympus inverted microscope with a 100x or a 60x oil-immersion objective. Spinning disk confocal microscopy is performed on a Nikon Eclipse T1 microscope with an Andor Evolution scanhead and a 60x water immersion objective.

Image Processing and data analysis. 2D- images: the contact angle is measured by adjusting two circles on liposomes on phase contrast or epifluorescence images after binarization. 3D-images: The geometrical parameters of the doublets are determined by optimizing the correlation between simulated and acquired 3D recording. Simulated 3D stacks, using [Python], [Numpy] and [Cython] are obtained by creating two spherical caps in contact, and reproducing the fluorescent signal of actin at the external surface. Optimizing the correlation between simulated and acquired data is done using [Python] and [SciPy] (Nelder–Mead simplex method from the "optimize" submodule). Initial fit parameters of the first frame of each timelapse are determined visually. For the subsequent frame, we use the optimized parameters as initial parameters. Robustness of fit is checked by repeating the fits several times while changing the initial fit parameters by a random amount drawn from a normal distribution of mean 0µm and standard deviation 0.5µm, then check that we obtain the same final fitted value range. The obtained eight parameters (2 centers with X,Y,Z coordinate, 2 liposomes radii) geometrically define contact angle and distance between centers. All the data processing was done in an [IPython] environment.

Bibliography

[1] A. G. Clark, K. Dierkes, E. K. Paluch, « Monitoring Actin Cortex Thickness in Live Cells », *Biophys. J.*, vol. 105, n° 3, p. 570-580, 2013.

[2] G. Salbreux, G. Charras, E. Paluch, « Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis », *Trends Cell Biol.*, 2012.

[3] E. Munro, J. Nance, J. R. Priess, « Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early C. elegans embryo », *Dev. Cell*, vol. 7, n° 3, p. 413-424, 2004.

[4] T. Lecuit P.-F. Lenne, « Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis », *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, n° 8, p. 633-644, 2007.

[5] M. Rauzi, P.-F. Lenne, T. Lecuit, « Planar polarized actomyosin contractile flows control epithelial junction remodelling », *Nature*, vol. 468, n° 7327, p. 1110-1114, 2010.

[6] M. Rauzi P.-F. Lenne, « Cortical forces in cell shape changes and tissue morphogenesis », *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 95, p. 93-144, 2011.

[7] J.-Y. Tinevez, U. Schulze, G. Salbreux, J. Roensch, J.-F. Joanny, E. Paluch, « Role of cortical tension in bleb growth », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n° 44, p. 18581-18586, 2009.

[8] R. Nambiar, R. E. McConnell, M. J. Tyska, « Control of cell membrane tension by myosin-I », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, n° 29, p. 11972-11977, 2009.

[9] D. Raucher, T. Stauffer, W. Chen, K. Shen, S. Guo, J. D. York, M. P. Sheetz, T. Meyer, « Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion », *Cell*, vol. 100, n° 2, p. 221-228, 2000.

[10] M. Krieg, Y. Arboleda-Estudillo, P.-H. Puech, J. Käfer, F. Graner, D. J. Müller, C.-P. Heisenberg, « Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish », *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, n° 4, p. 429-436, 2008.

[11] E. C. Schwarz, E. M. Neuhaus, C. Kistler, A. W. Henkel, T. Soldati, « Dictyostelium myosin IK is involved in the maintenance of cortical tension and affects motility and phagocytosis », *J. Cell Sci.*, vol. 113 (Pt 4), p. 621-633, 2000.

[12] T. Luo, K. Mohan, P. A. Iglesias, D. N. Robinson, « Molecular mechanisms of cellular mechanosensing », *Nat. Mater.*, vol. 12, n° 11, p. 1064-1071, 2013.

[13] W. Engl, B. Arasi, L. L. Yap, J. P. Thiery, V. Viasnoff, « Actin dynamics modulate mechanosensitive immobilization of E-cadherin at adherens junctions », *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, n° 6, p. 587-594, 2014.

[14] J.-L. Maître, H. Berthoumieux, S. F. G. Krens, G. Salbreux, F. Jülicher, E. Paluch, C.-P. Heisenberg, « Adhesion Functions in Cell Sorting by Mechanically Coupling the Cortices of Adhering Cells », *Science*, vol. 338, n° 6104, p. 253-256, 2012.

[15] M. P. Murrell M. L. Gardel, « F-actin buckling coordinates contractility and severing in a biomimetic actomyosin cortex », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2012.

[16] K. Carvalho, F. C. Tsai, E. Lees, R. Voituriez, G. H. Koenderink, C. Sykes, « Cell-sized liposomes reveal how actomyosin cortical tension drives shape change », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013.

[17] K. Carvalho, J. Lemière, F. Faqir, J. Manzi, L. Blanchoin, J. Plastino, T. Betz, C. Sykes, « Actin polymerization or myosin contraction: two ways to build up cortical tension for symmetry breaking », *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 368, n° 1629, 2013.

[18] M. Angelova D. Dimitrov, « Liposome electroformation », *Faraday Discuss.*, vol. 81, p. 303+, 1986.

[19] O. Sandre, L. Moreaux, F. Brochard-Wyart, « Dynamics of transient pores in stretched vesicles », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, n° 19, p. 10591-10596, 1999.

[20] J. van der Gucht, E. Paluch, J. Plastino, C. Sykes, « Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, n° 22, p. 7847-7852, 2005.

[21] J. Sedzinski, M. Biro, A. Oswald, J.-Y. Tinevez, G. Salbreux, E. Paluch, « Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow », *Nature*, vol. 476, n° 7361, p. 462-466, 2011.

[22] P. Kunda, A. E. Pelling, T. Liu, B. Baum, « Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis », *Curr. Biol. CB*, vol. 18, n° 2, p. 91-101, 2008.

[23] E. Abu Shah K. Keren, « Symmetry breaking in reconstituted actin cortices », *eLife*, vol. 3, p. e01433, 2014.

[24] T. Luo, V. Srivastava, Y. Ren, D. N. Robinson, « Mimicking the mechanical properties of the cell cortex by the self-assembly of an actin cortex in vesicles », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 104, n° 15, p. 153701, 2014.

[25] G. H. Koenderink, Z. Dogic, F. Nakamura, P. M. Bendix, F. C. MacKintosh, J. H. Hartwig, T. P. Stossel, D. A. Weitz, « An active biopolymer network controlled by molecular motors », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, n° 36, p. 15192-15197, 2009.

[26] Y. Y. Toyoshima, S. J. Kron, E. M. McNally, K. R. Niebling, C. Toyoshima, J. A. Spudich, « Myosin subfragment-1 is sufficient to move actin filaments in vitro », *Nature*, vol. 328, n° 6130, p. 536-539, 1987.

[27] M. S. E. Silva, M. Depken, B. Stuhrmann, M. Korsten, F. C. Mackintosh, G. H. Koenderink, « Active multistage coarsening of actin networks driven by myosin motors », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011.

Figure 1

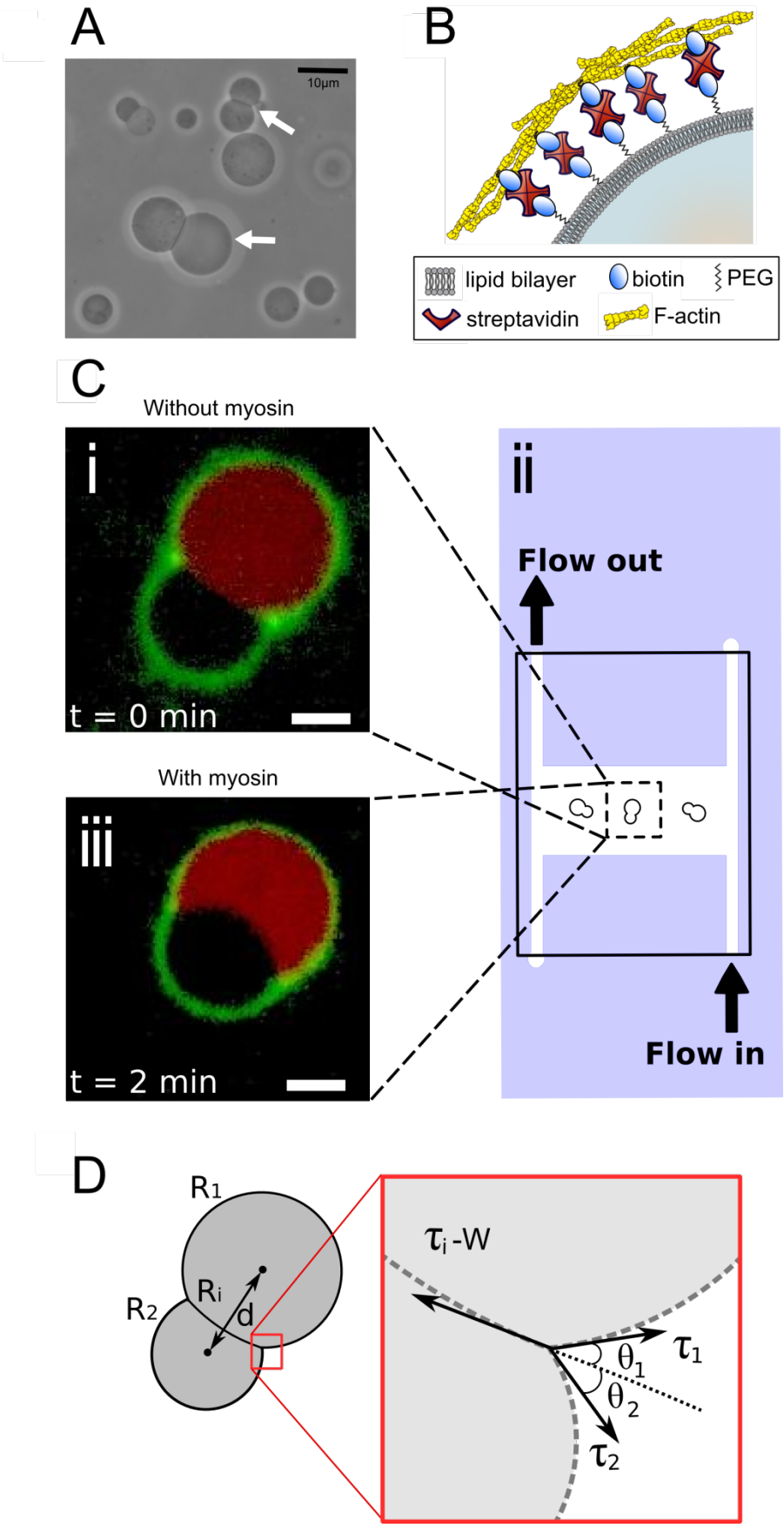
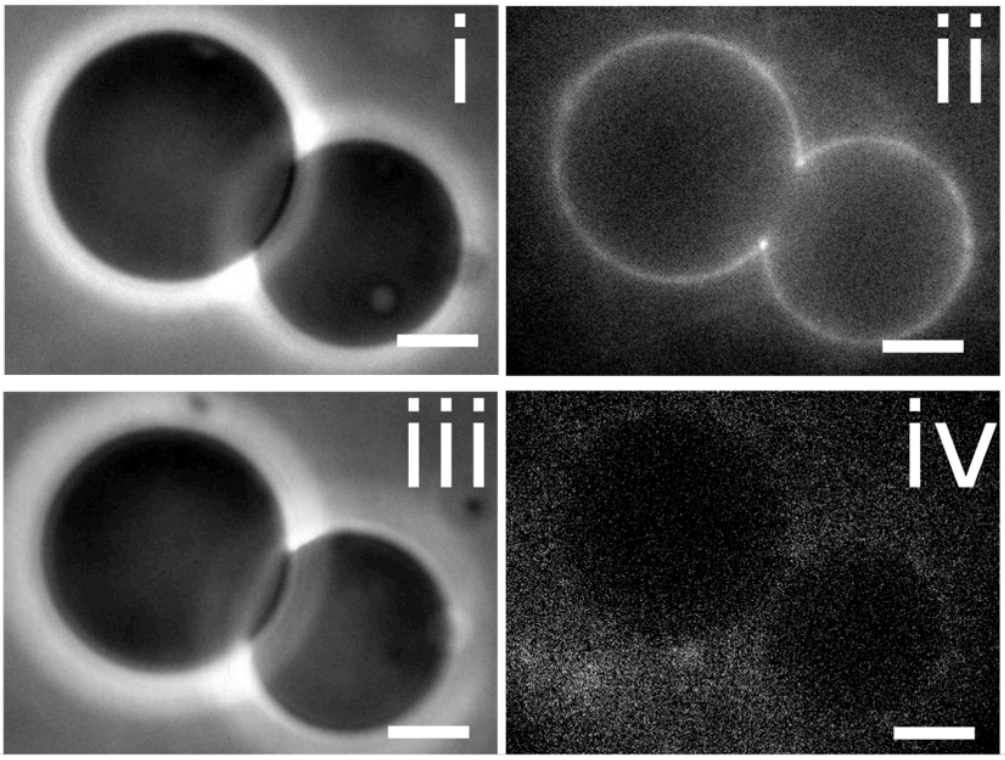

A
10μm
B
lipid bilayer
biotin
PEG
streptavidin
F-actin
C
Without myosin
i
t = 0 min
ii
Flow out
With myosin
iii
t = 2 min
Flow in
D
R1
R2
Ri
d
τi -W
θ1
θ2
τ1
τ2

Figure 2

A


i
ii
iii
iv

B

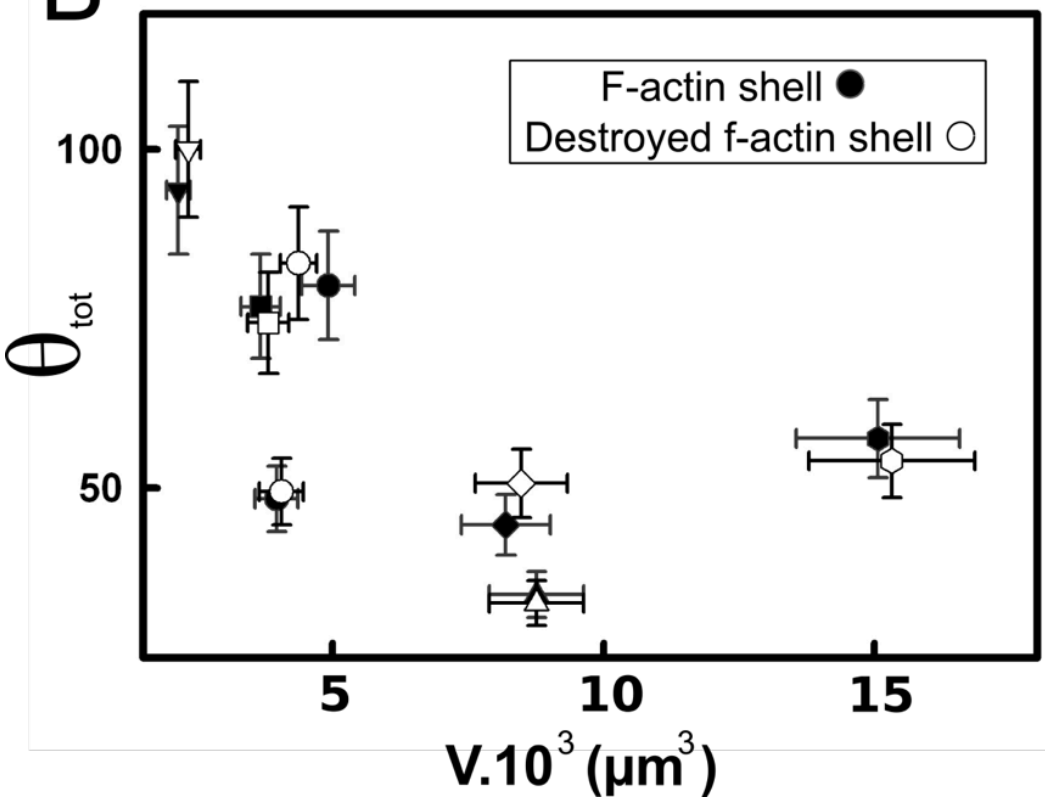

F-actin shell
Destroyed f-actin shell
100
50
Θ_{tot}
5
10
15
$V.10^3$ (μm^3)

Figure 3

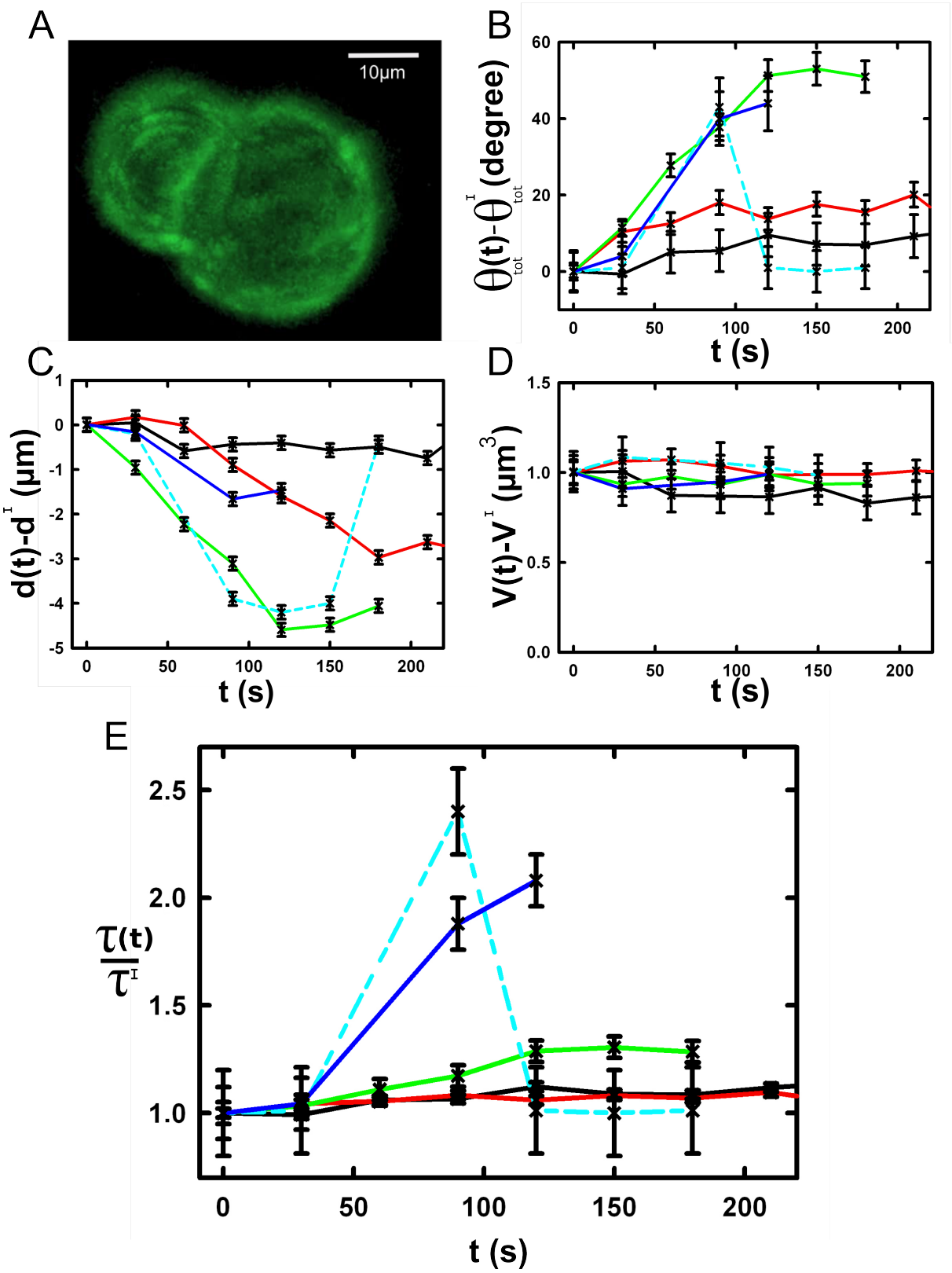

A
10µm
B
$\theta_{tot}(t)-\theta_{tot}^{I}$ (degree)
t (s)
C
$d(t)-d^{I}$ (µm)
t (s)
D
$V(t)-V^{I}$ (µm^3)
t (s)
E
$\frac{\tau(t)}{\tau^{I}}$
t (s)

Figure Captions

Figure 1: Cell-sized liposome doublets. A) Doublets, indicated by white arrows, in the field of view of a phase contrast microscope. B) Schematic of the stabilized actin cortex at the membrane (proteins not to scale). C) i) Macrofluidics chamber designed to exchange the outside buffer. Doublets are visualized in the middle horizontal channel of the H shape chamber to avoid movement during the buffer exchange. Spinning disk images of the doublet before ii) or after iii) myosin II injection. One liposome contains SRB (red) to visualize the interface of the doublet, actin cortex is labeled in green. Scale bar 5µm. D) Simplification of the doublet with the three characteristic radii. Inset: enlargement of the contact interface between the two liposomes with the Young's tension vector and the contact angle.

Figure 2: Effect of an actin cortex on the doublet's shape. A) Image of the same doublet coated with fluorescent actin before i) ii) and after iii) iv) actin cortex disruption. The actin cortex is visualized by epifluorescence ii) iv) and the doublet by phase contrast i) iii). Scale bar 5µm. B) Measurement of the contact angle between the two liposomes as a function of their volume, before (black) and after (white) disruption of the stabilized actin cortex.

Figure 3: Geometrical parameters over time: A) 3D reconstruction of a doublet surrounded by actin. Note that there is no actin at the interface between the liposomes. B) Evolution of the contact angle compare to the initial one as a function of time. Each doublet is represented by a different line color. C) Evolution of the distance between the two liposomes center over time. D) Evolution of the volume ratio over time. E) Increase of the tension ratio between the tension $\tau(t)$ at time t and the initial one τ^{I}. Note that the blue dashed line A-B-C-D) corresponds to the evolution of geometrical parameters of the same doublet, analyzed even after actin cortex rupture. It recovers its initial parameter values.

Chapitre 6

Caractérisation de la dynamique de polymérisation de l'actine sur la force de maintien d'un tube de membrane lipidique

Sommaire

6.1 Présentation du montage expérimental 154
6.2 Evolution de la force par ajout de la polymérisation de l'actine 159
6.2.1 Caractérisation des membranes nues 159
6.2.2 Injection de l'actine 160
6.2.3 Polymérisation de l'actine 163
6.2.4 Et si on retirait ? 165
6.3 Expériences supplémentaires 168
6.3.1 En présence de la toxine de Shiga 168
6.3.2 En présence de la myosine II 169
6.4 Conclusion 169

Que ce soit à travers les travaux menés en collaboration avec l'équipe de Ludger Johannes avant mon arrivée [Römer *et al.* 2010] ou ceux présentés au chapitre 4, il apparaît que la polymérisation de l'actine joue un rôle important dans les mécanismes d'endocytose. Afin d'approfondir un peu plus le rôle de l'actine sur la mécanique des déformations membranaires nous avons étudié l'effet de la polymérisation de l'actine sur des structures tubulaires de membrane. Les premières expériences ont été effectuées au sein de l'équipe de Patricia Bassereau. Nous avons ensuite mis au point un nouveau montage expérimental en spinning disk. Ce dernier permet de tirer des tubes de membranes, d'en contrôler leurs longueurs et leurs rayons, de polymériser un réseau à leurs surfaces et de mesurer en direct l'effet de la polymérisation de l'actine.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont déjà donné lieu à des résultats préliminaires. Toutes choses ayant une fin, même une thèse, je n'ai pas eu le temps de finir cette étude. Elle est actuellement entre les mains de Fabrice Valentino qui a donc la

lourde tâche de poursuivre ces travaux. Dans un premier temps je présente le montage mis en place ainsi que les méthodes biochimiques utilisées pour polymériser un réseau d'actine dans ces conditions particulières. Nous montrerons les premiers résultats obtenus, correspondant à l'effet de la polymérisation de l'actine sur les tubes de membranes et correspondant à l'effet de la myosine ou de la toxine de Shiga sur ces déformations membranaires.

6.1 Présentation du montage expérimental

Le montage optique

Le montage optique est semblable à celui présenté au chapitre3 pour ce qui est de la multi-pince optique. A ce système nous avons ajouté une pince optique fixe. Celle-ci est obtenue en scindant la polarisation du faisceau laser en deux et l'on peut moduler sa puissance par un modulateur acousto-optique (AOM). Afin de mesurer dynamiquement les déplacements des billes dans les deux types de pinces optiques, une platine est ajoutée au dessus du système sur laquelle deux détecteurs de position sont installés. Chacun d'eux enregistre la déflection du faisceau laser en fonction de sa polarité. Un spinning disk, couplé à une caméra Néo sCMOS (ANDOR) refroidie à -40°C, est ajouté au microscope pour permettre, grâce à trois lasers, de prendre des images de fluorescence dans le vert, le rouge et le rouge lointain. Le montage est équipé sur sa platine d'un système de micromanipulation que l'on détaillera un peu plus loin. On présente FIG :6.1, le montage optique.

La chambre

La chambre que nous avons mis au point est facilement fixée au porte échantillon grâce à quatre aimants en néodine. Deux fines lames de métal de 2 mm d'épaisseur, dont la distance est réglable, permettent de changer la longueur de la chambre. On utilise deux lamelles, préalablement découpées au stylo diamant, que l'on vient fixer à la graisse (Dow corning®, high vacuum grease) au dessus et en dessous de lames de métal de manière à former le fond et la partie supérieure de la chambre. On contrôle, par l'épaisseur des lames de métal, la hauteur de chambre. De plus, deux côtés de la chambre restent ouverts et accessibles ce qui permet de venir injecter des solutions ou d'y insérer les mircopipettes une fois que la chambre est installée sur le porte échantillon (FIG :6.2).

La platine

Une fois que la chambre est posée sur le porte échantillon on peut disposer de par et d'autre les micropipettes (FIG :6.3). La micropipette d'aspiration permet de

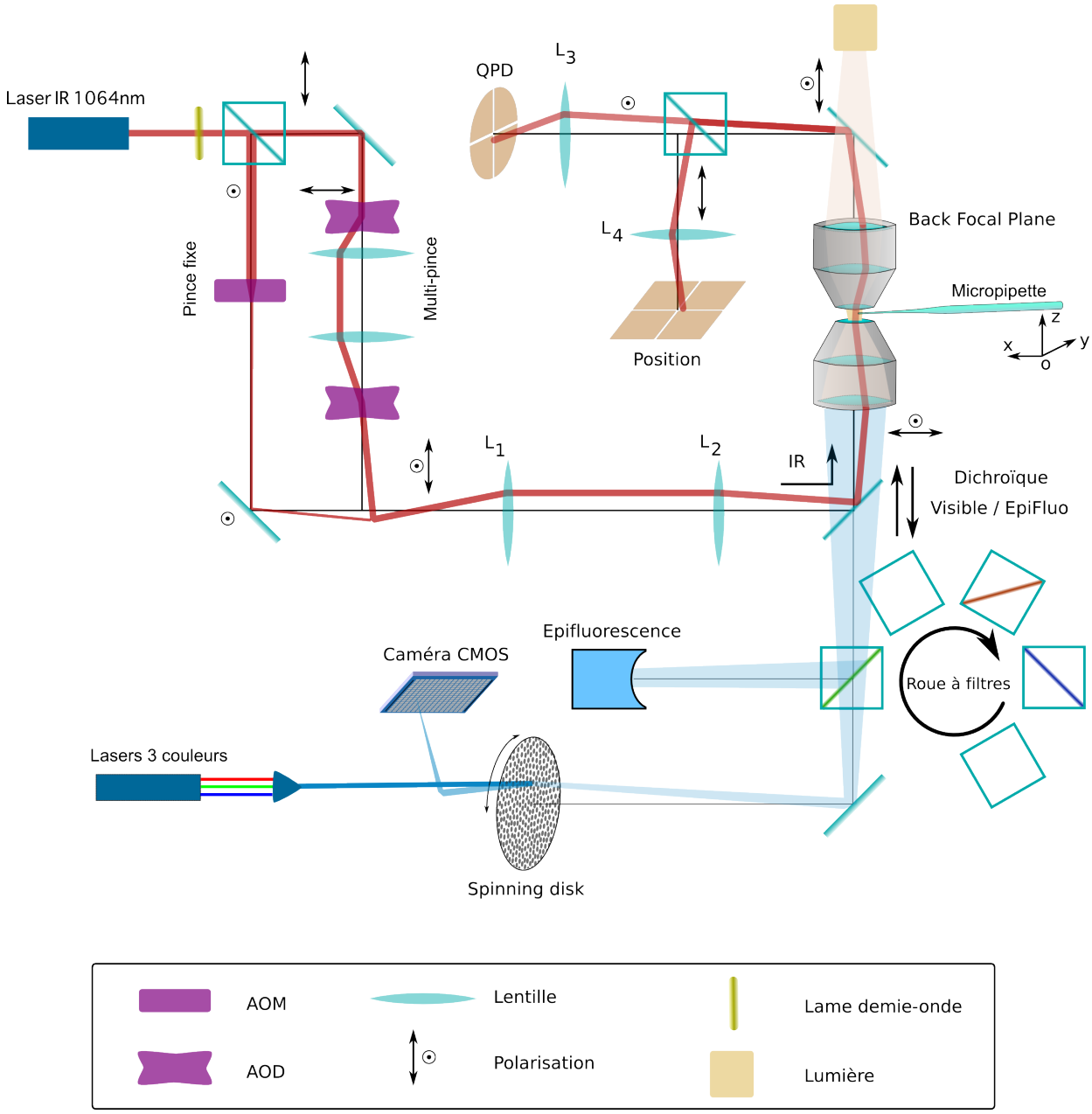


FIGURE 6.1 – Schéma du montage expérimental. Il comporte une pince multiple contrôlée par un AOD, une pince fixe, un spinning disk à trois couleurs, une lampe à mercure, un système de roue à filtres, une diode quatre cadrans ainsi qu'un détecteur de position. Au niveau de l'échantillon la platine a été aménagée afin de pouvoir insérer des micropipettes contrôlées par un piezo. Dessin de Matthias Bussonnier

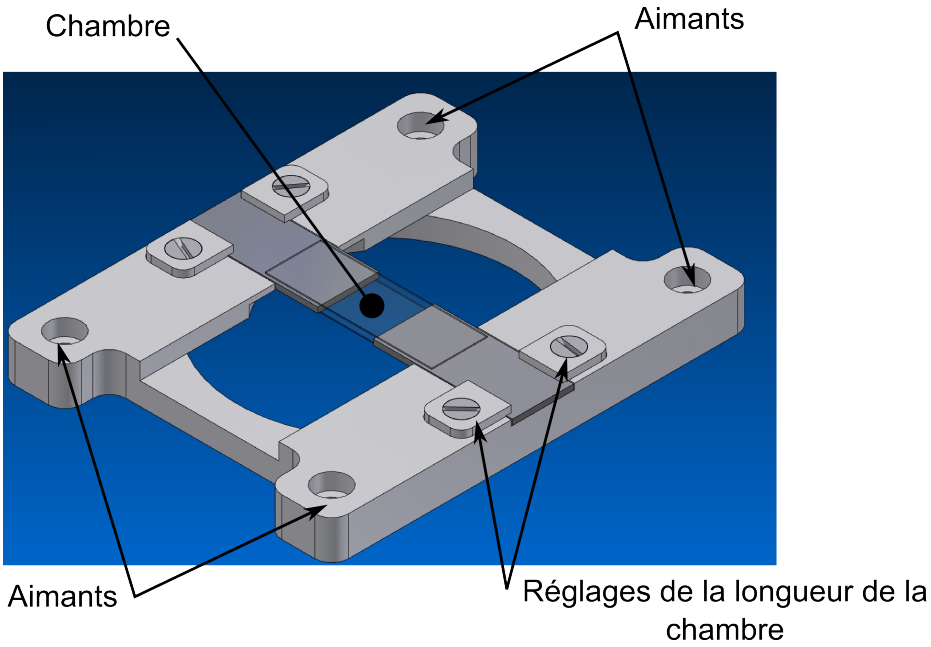


FIGURE 6.2 – Schéma de la chambre utilisée pour les expériences de tirage de tubes de membrane. Grâce à un système de lamelles métalliques réglables en longueur on peut moduler le volume de la chambre, réglé en général pour faire ∼200 µL. Deux lamelles de verres maintenues sur le métal permettent de former le fond et le haut de la chambre d'observation. Les deux côtés de la chambres sont laissés ouvert afin de permettre l'insertion des micropipettes ultérieurement.

maintenir le liposome et de contrôler la tension de sa membrane. Elle est attachée à un micromanipulateur piezo électrique afin de pouvoir la déplacer de manière très précise et sans à-coup. La micropipette d'injection quant à elle sert à injecter, durant l'expérience, les protéines qui interagissent avec les membranes. Elle est attachée à un micromanipulateur hydraulique à trois axes (MM0-203, NARISHIGE) pour pouvoir la déplacer sans faire vibrer la platine.

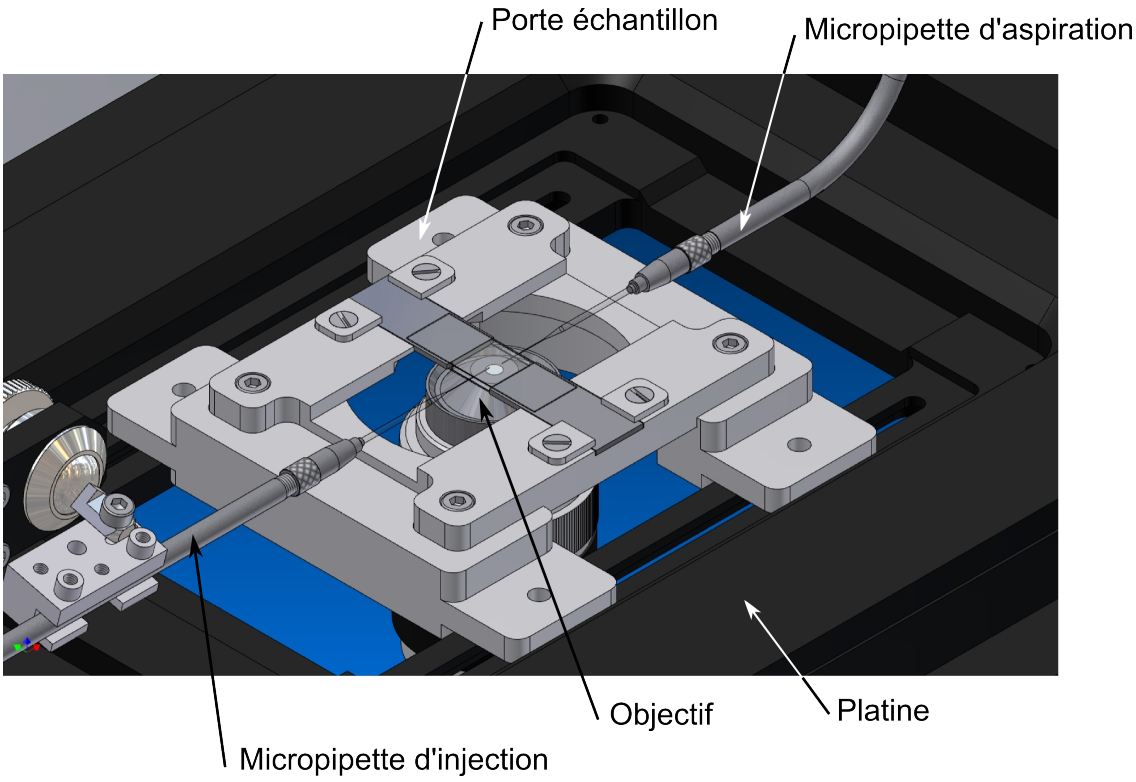


FIGURE 6.3 – Schéma de la platine une fois que la chambre et les micropipettes sont installées. Une des micropipettes sert à aspirer un liposome et contrôle la tension membranaire alors que l'autre sert à injecter au voisinage du liposome un mélange de protéines pour activer la polymérisation de l'actine.

Le contrôleur de pression

Chacune des deux micropipettes est reliée par un tube tygon®(Harvard apparatus) à un réservoir d'eau. Ce système permet de contrôler, à travers la différence de hauteur entre la micropipette et le réservoir, la pression hydrostatique (ou le flux) en sortie de la micropipette. Il est donc nécessaire de pouvoir mesurer précisément le déplacement en hauteur de ces réservoirs. On montre FIG :6.4, la manière dont ces réservoirs sont

construits. Il est important d'éliminer toutes les bulles d'air dans les tuyaux avant de commencer à équilibrer la pression osmotique, dans la chambre, avec la pression hydrostatique, au niveau de la micropipette.

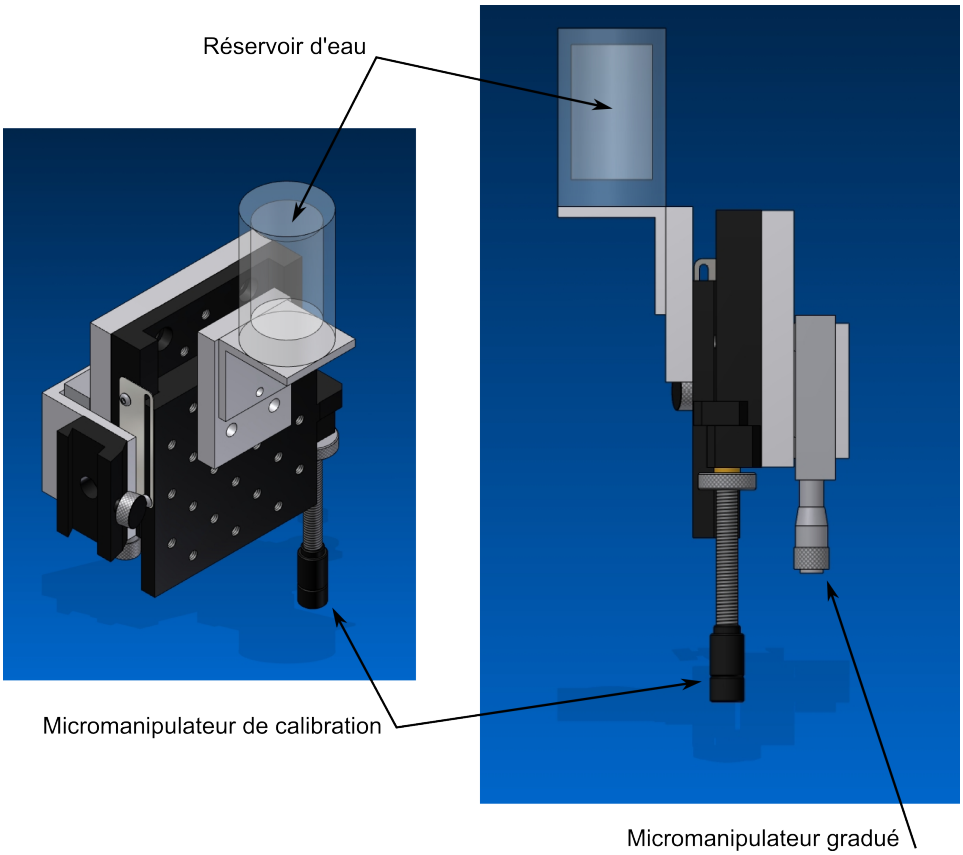


FIGURE 6.4 – Schéma du système de réservoir d'eau relié à une micropipette. Grâce à un premier micromanipulateur on peut ajuster la hauteur du réservoir par rapport à la platine de manière à ne pas engendrer de flux. Une fois la calibration effectuée on n'utilise plus que le micromanipulateur gradué pour déplacer le réservoir. De cette manière on connaît la hauteur de déplacement et donc la pression hydrostatique en sortie de la micropipette.

6.2 Evolution de la force par ajout de la polymérisation de l'actine

6.2.1 Caractérisation des membranes nues

Nous sommes partis des expériences de mesure de κ avec des liposomes électroformés composés d'EPC à 99,9% et de 0,1% molaire de PEG-biot dans des solutions tampons composées uniquement de sels et de sucres. Progressivement, nous avons complexifié le système d'étude en changeant les tampons utilisés ainsi que la composition de la membrane, afin d'avoir un système qui permette à l'actine de polymériser à la surface des liposomes. En plus de la technique d'électroformation nous avons aussi fait plusieurs mesures sur des liposomes obtenus par émulsion inverse. On présente dans le TABLE 6.1 quelques unes de ces mesures. Pour résumer, plus le mélange lipidique est complexe et plus les mesures de κ sont dispersées. De même, lorsque l'on travaille sur des liposomes obtenus par émulsion inverse, les valeurs de κ sont plus dispersées que celle obtenues pour des liposomes électroformés. Par ailleurs, alors que seulement 0,1% de PEG-biot suffisent à attacher les billes recouvertes de streptavidine à la surface des liposomes électroformés, ce même pourcentage n'est pas suffisant pour coller les billes sur des liposomes formés par émulsion inverse. Nous avons donc augmenté la quantité de lipides PEG-biot jusqu'à 1% lorsque l'on travaille en émulsion inverse afin de retrouver les mêmes conditions de liaison que l'on obtient avec les liposomes électroformés (avec 0,1% de PEG-biot).

Initialement nous utilisions des fluorophores que l'on insérait dans la membrane des liposomes afin de visualiser, en microscopie confocale, les liposomes. Malgré plusieurs essais avec différents types de fluorophores (Texas Red DHPE, Bodipy-FL, C18-DIi) leur présence au sein des membranes influence de manière négative la polymérisation de l'actine. Nous avons donc décidé d'éliminer les fluorophores de la composition membranaire dans la suite.

Lorsqu'un tube de membrane est tiré, la force enregistrée par la pince optique reste constante même si la longueur du tube varie. Si l'on diminue la longueur du tube de membrane, les lipides retournent dans le liposome qui sert de réservoir. Il est à noter qu'il y a quelques différences de comportements mécaniques des tubes de membranes suivant qu'ils sont tirés à partir de liposomes électroformés ou obtenus par émulsion inverse. Même si les deux types de membranes se ressemblent (épaisseur, κ) elles ont des comportements dynamiques différents [Campillo *et al.* 2013]. Lorsque l'on compare les expériences effectuées sur ces deux types de membranes, les mesures sont faites en régime statique.

TABLE 6.1 – Tableau récapitulant les mesures de κ pour différents mélanges lipidiques et méthodes de formation des liposomes. Chaque donnée est obtenue par 6 mesures effectuées sur 6 différents liposomes.

Méthode	Lipides (% molaire)	κ (KT)
Electroformation	EPC(99)/PEG-biot(1)	$14,4 \pm 0,4$
	EPC(99,9)/PEG-biot(0,1)	$12,4 \pm 1,8$
Emulsion inverse	EPC(99)/PEG-biot(1)	$10,3 \pm 5,1$
	EPC(59)/PEG-biot(1)/TR(0,05)/Chol.(30)/NTA-Ni(10)	$11 \pm 4,5$

6.2.2 Injection de l'actine

Afin de maîtriser le début de la polymérisation nous avons divisé le mélange biochimique en deux solutions. La solution dans laquelle se trouvent les liposomes contient aussi le complexe Arp2/3 et l'activateur de la polymérisation. La micropipette est remplie d'une solution d'actine-G préparée la veille (TPG : Annexe B.1) et de profiline. Ce n'est seulement qu'en mettant c'est deux solutions en contact que l'on peut initier la polymérisation de l'actine.

- dans la chambre d'observation d'environ 200 µL :
  La chambre d'observation est passivée en l'incubant durant 30 min avec une solution de β-caséine à 5 mg.mL^{-1} puis rincée. On ajoute ensuite le tampon extérieur (TPE : Annexe B.2.2.1) auquel on rajoute 0,64 µM d'activateur et 120 nM d'Arp2/3. Les liposomes sont injectés délicatement à un bout de la chambre et les billes de polystyrène de l'autre côté afin qu'ils ne soient pas mis en contact les uns avec les autres. On ferme les côtés restés ouverts de la chambre d'observation avec une goute d'huile et on patiente environ 10 min, le temps que les billes sédimentent.

- dans la micropipette d'injection :
  Dans le tampon d'injection (TPE$_{inj}$:Annexe B.2.2.2) on ajoute de l'actine à 20% molaire fluorescente à 3 µM avec de la profiline à 9 µM. Ce mélange permet de garder l'actine sous forme G grâce à la faible concentration en sels et le manque d'ATP, ainsi qu'à la présence de la profiline dans le tampon.

On évite ainsi de provoquer la polymérisation de l'actine dans la micropipette, ce qui aurait pour effet de la boucher (FIG :6.5). Une fois injectée dans la chambre l'actine peut polymériser puisqu'elle se trouve en présence à la fois de l'activateur et du complexe Arp2/3.

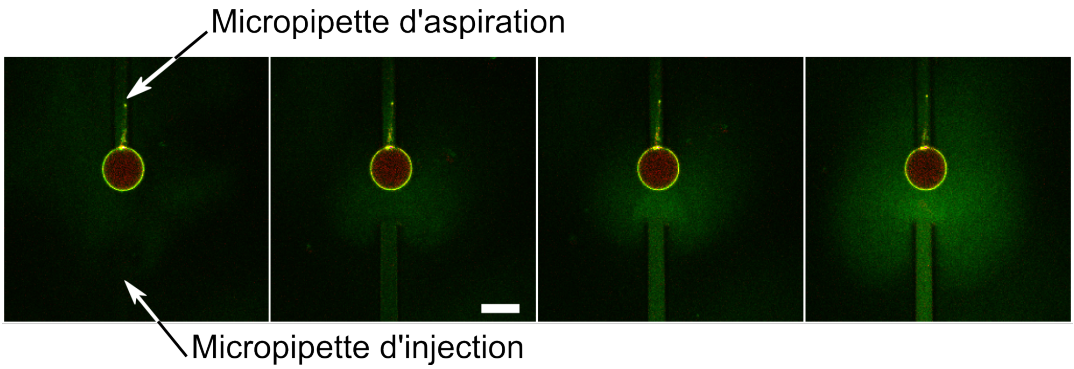


FIGURE 6.5 – Chronophotographie au confocal de l'injection d'actine fluorescente (vert) sur un liposome (rouge) contenant un fluorophore à la membrane (vert). L'actine est injectée par une micropipette sous sa forme G proche du liposome. Le liposome est maintenu par une deuxième micropipette en l'aspirant, de cette manière on l'empêche de bouger sous l'influence du flux d'actine et on contrôle sa tension membranaire. Dans cet exemple la solution extérieure ne contient ni l'activateur ni le nucléateur de la polymérisation de l'actine, ce qui explique qu'il n'y ait pas de polymérisation. Echelle 5 µm.

Il est nécessaire de laisser incuber les liposomes avec l'activateur de la polymérisation durant une quinzaine de minutes. C'est pour cette raison que l'activateur est ajouté dans la chambre, en même temps que les liposomes. Initialement nous avons travaillé avec l'activateur pVCA-Gst-Hist. Cependant, avec cet activateur, au bout de quelques minutes les liposomes sédimentent dans le fond de la chambre et s'étalent rendant leur manipulation impossible. Ce phénomène apparaît encore plus tôt si les liposomes sont simplement pré-incubés avec pVCA-Gst-Hist avant d'être transférés dans la chambre. L'étiquette Gst présente sur cet activateur est connue pour dimériser et adhérer au verre, ce qui explique que les liposomes adhèrent à la surface. L'ajout d'agent de surface sur les lamelles n'y changeant rien nous avons modifié l'activateur. La première idée a donc été de cliver la Gst de la protéine à l'aide de la thrombine et de vérifier que son activité n'était pas modifiée par des tests en pyrene (FIG :6.6).

Le test de l'actine pyrène permet de suivre la cinétique de polymérisation de l'actine par spectrofluorescence. Ce test permet de mettre en évidence le rôle de protéines, que l'on rajoute au mélange biochimique, sur la vitesse de polymérisation. L'actine pyrène n'est pas fluorescente sous forme monomérique, par contre, une fois assemblée en filaments elle devient fluorescente. On peut donc relier l'intensité de fluorescence de ce test à la quantité d'actine polymérisée. Dans notre cas, à partir d'un mélange de 3 µM d'actine pyrène, 9 µM de profiline et 100 nM de complexe Arp2/3, nous avons comparé trois conditions :

- Sans activateur, la courbe sert alors de contrôle. Sans la présence de l'activateur la polymérisation a lieu, mais reste lente (courbe rouge FIG :6.6).
- Avec 200 nM de pVCA-Gst-Hist, la croissance des filaments d'actine est accélérée par rapport au cas précédent et fini par atteindre le palier de l'état stationnaire (courbe bleue FIG :6.6).
- Avec 200 nM de pVCA-Hist la cinétique de polymérisation de l'actine est quasiment la même que celle obtenue avec l'activateur non couplé (courbe noire FIG :6.6). Le clivage de la Gst ne modifie donc pas la vitesse de polymérisation.

Nous ne sommes malheureusement pas parvenus à purifier une deuxième fois cette protéine. Plus tard nous avons donc mis au point un nouvel activateur, se liant aux membranes biotinylées par une étiquette streptavidine, à la place de l'histidine.

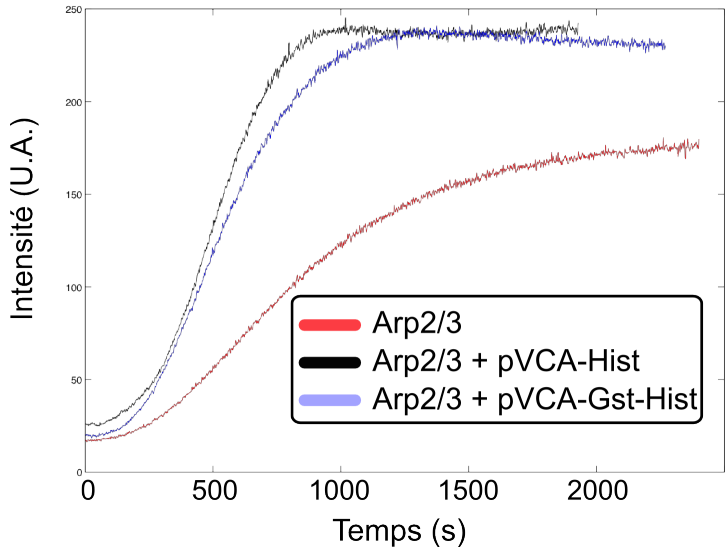


FIGURE 6.6 – Test au spectrofuorimètre de la cinétique de polymérisation de l'actine pyrène sous trois conditions. En rouge le mélange biochimique ne contient que Arp2/3 et l'actine, après une courte phase d'attente ($\sim$ 150 s) la polymérisation de l'actine se déclenche. En noir l'activateur pVCA-Gst-Hist est ajouté au mélange ce qui a pour effet d'augmenter la cinétique de polymérisation. En bleu le même activateur est ajouté avec la même concentration mais nous avons clivé la Gst à la thrombine. Malgré ce clivage l'activité de l'activateur reste inchangée.

6.2.3 Polymérisation de l'actine

Notre système permet de polymériser de l'actine à la surface du tube au bout d'une dizaine de minutes (FIG :6.7).

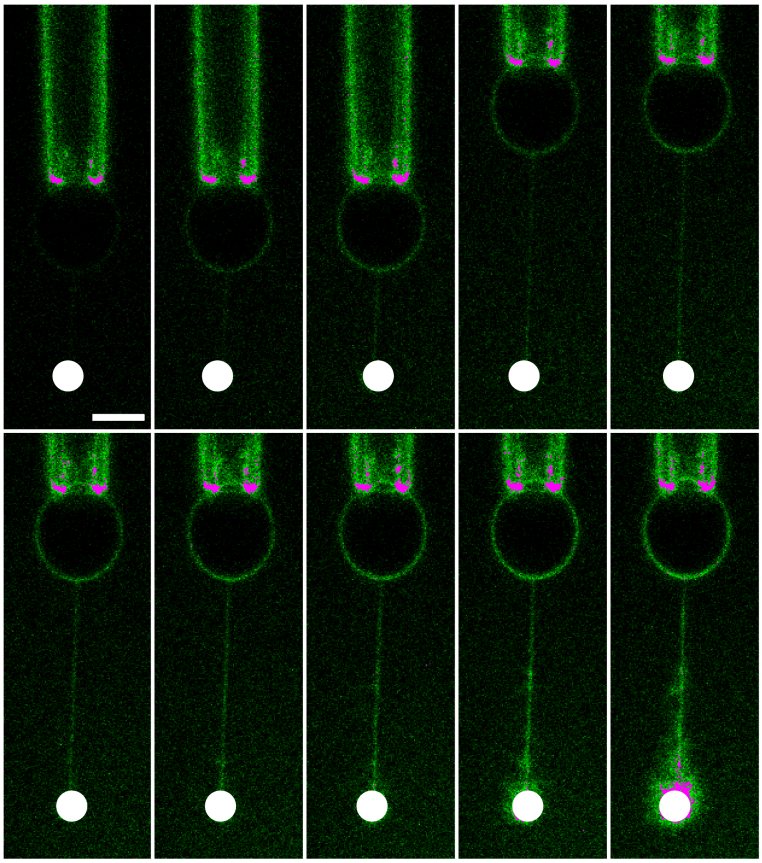


FIGURE 6.7 – Image en microscopie confoncale d'un tube de membrane tiré à partir d'un liposome aspiré par une micropipette. Le tube est maintenu par une pince optique qui piège une bille recouverte de streptavidine (en blanc). Grâce à une deuxième micropipette (hors champ) de l'actine (verte) est injectée dans l'environnement proche du tube de membrane et polymérise à sa surface. Echelle 5 µm.

Le fait d'ajouter un réseau change considérablement les propriétés mécaniques par rapport à ce que l'on observe sur membrane nue. Si l'on cherche à diminuer la longueur du tube de membrane celui-ci ne se rétractera plus dans la membrane du liposome. On assiste à un phénomène de flambage, le tube fléchit et se déforme dans une direction perpendiculaire à l'axe de compression (FIG :6.8).

Ce phénomène indique que le tube de membrane est stabilisé. Afin de s'en assurer

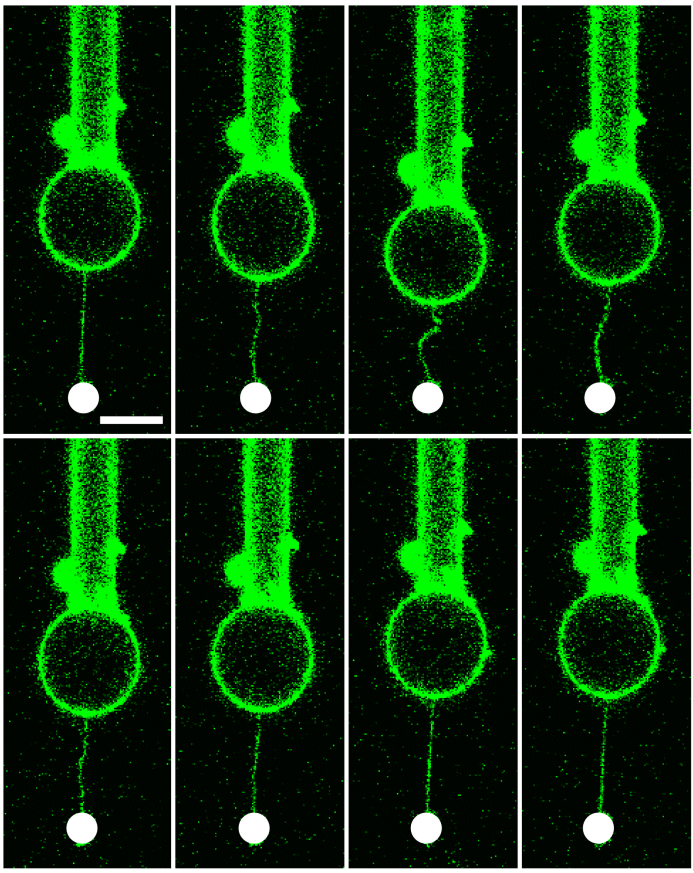


FIGURE 6.8 – Une fois qu'un réseau d'actine (en vert) s'est formé à la surface du tube celui-ci est stabilisé. Lorsque l'on cherche à diminuer la longueur du tube en rapprochant le liposome du piège optique le tube de membrane flambe. Echelle 5 µm.

nous avons enregistré la force de maintien du tube lorsque l'on polymérise de l'actine à sa surface (FIG :6.9). Quand on extrude un tube d'un liposome à basse tension, la force augmente aux alentours de 10 pN. En aspirant un peu plus on augmente la tension de membrane. Cette étape permet de mesurer le κ du liposome nu, sans actine. On approche ensuite la micropipette d'injection et l'on déclenche le flux d'actine. Alors que l'on observe une augmentation de la fluorescence à la surface de la membrane on enregistre en même temps une diminution de la force de maintien du tube qui tombe à 0 pN.

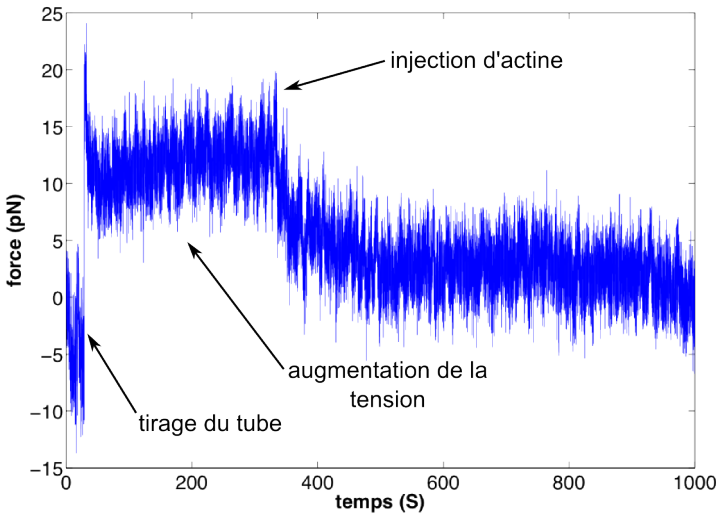


FIGURE 6.9 – Force de maintien du tube de membrane au cours du temps, avant et après la polymérisation de l'actine à sa surface. Lorsque le réseau d'actine commence à se former sur la membrane la force diminue.

Des expériences effectuées sur liposomes, avec la toxine de Shiga et la polymérisation de l'actine ont montré le rôle crucial de la dynamique de polymérisation sur l'internalisation des tubules de StxB [Römer *et al.* 2010]. Le modèle présenté ici ne sonde que l'effet mécanique de la polymérisation de l'actine sur une géométrie membranaire similaire. Dans ce cas, les expériences préliminaires présentées dans ce paragraphe montrent que la dynamique de polymérisation à la surface d'un tube de membrane stabilise le tube au lieu de contribuer à sa scission.

6.2.4 Et si on retirait ?

Aucun fluorophore n'est présent dans la membrane du liposome mais nous voulions savoir si le tube de membrane lipidique était toujours présent. Nous avons alors décidé de tirer sur le tube une fois que l'actine a polymérisé à sa surface, et ensuite de

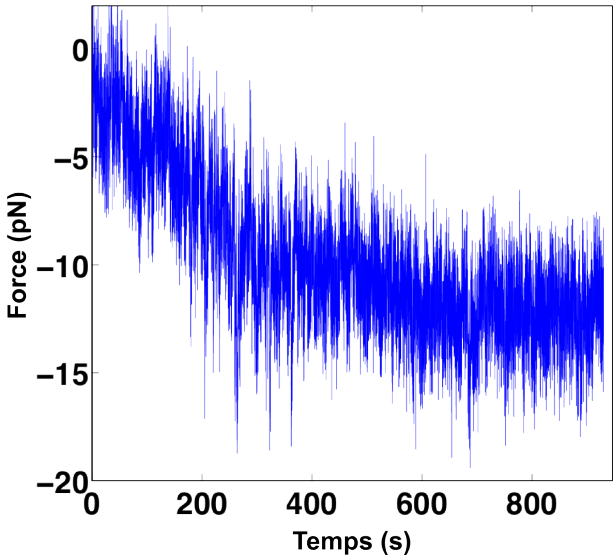


FIGURE 6.10 – Enregistrement de la force de maintien du tube une fois qu'il a été rallongé. A t=0 s le tube est allongé et l'on fixe ici arbitrairement la force à 0 pN. Alors que l'on réinjecte l'actine la partie nouvellement tirée du tube de membrane se recouvre d'actine et la force enregistrée par la pince optique diminue à nouveau.

réinjecter de l'actine. Le tout, en continuant la mesure de force via la pince optique (FIG :6.11). Non seulement le tube de membrane est toujours présent mais la partie nouvellement tirée est complètement nue. Le simple fait de tirer le tube fait remonter la force à ∼10 pN, ce qui se trouve être la force enregistrée avant que l'on démarre la polymérisation. Lorsque l'actine polymérise sur cette partie nue du tube on retrouve à nouveau une décroissance de la force. Le tube est à nouveau stabilisé (FIG :6.10). Ainsi, la polymérisation de l'actine à la surface d'un tube de membrane contribue à sa stabilisation.

Le fait de retirer sur un tube déjà recouvert d'actine induit une augmentation de la force de maintien du tube égale à celle que l'on observe initialement, avant d'injecter de l'actine. Autrement dit, toute la partie recouverte d'actine est stabilisée et ne semble pas influencer le reste du tube nu. D'un point de vue de la mesure de force, cela reviendrait à positionner la bille à l'interface entre la partie recouverte d'actine et la partie dénudée du tube de membrane.

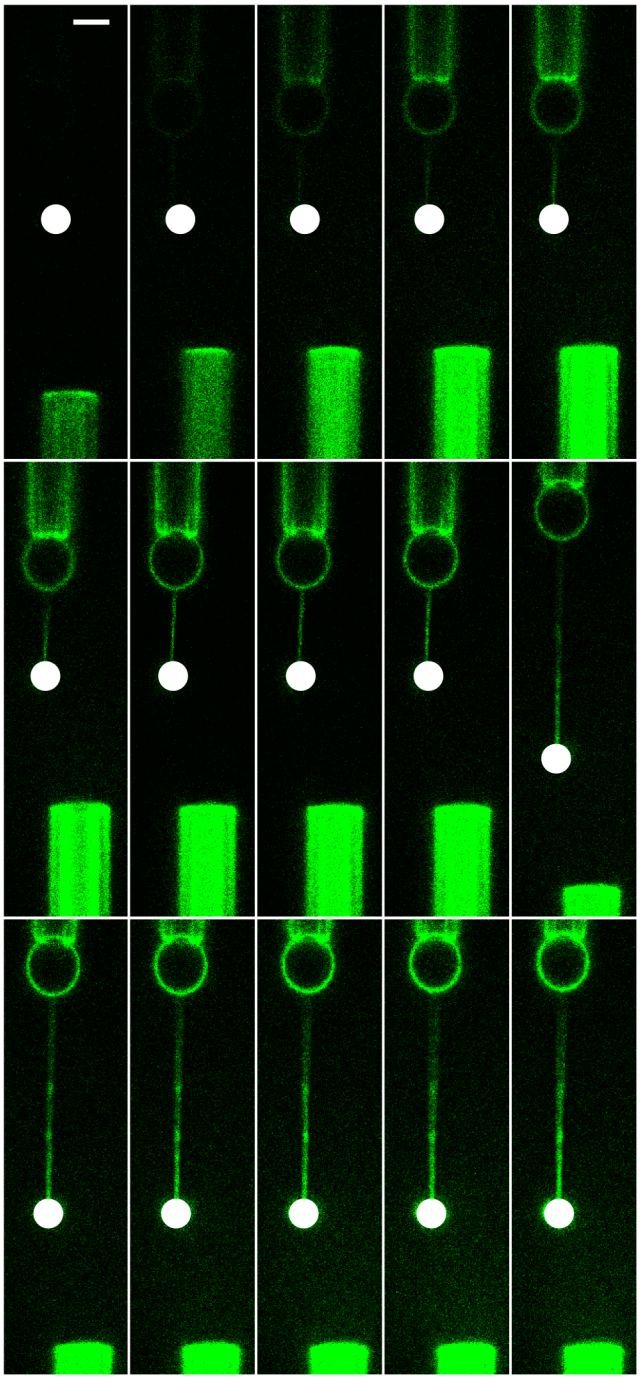


FIGURE 6.11 – De l'actine G est injectée sur un tube de membrane tiré à partir d'un liposome aspiré par une micropipette. Une fois le tube complètement recouvert d'actine on éloigne à nouveau le liposome de la bille, le tube recouvert d'actine reste tendu. L'actine G, qui continue à être injectée vient polymériser à la surface du tube nouvellement tiré et initialement nu. Echelle 5 µm.

6.3 Expériences supplémentaires

6.3.1 En présence de la toxine de Shiga

D'autres expériences ont été menées sur le même système de base, permettant la polymérisation de l'actine mais en ajoutant à l'intérieur du liposome la toxine de Shiga (FIG :6.12). Le liposome formé par émulsion inverse contient 40 µg/mL de StxB, sa membrane est constituée de 5% de GB3, 1% de PEG-biot 15% de cholestérol et 79% d'EPC. Une fois le tube extrudé, on patiente (∼15 min) avant d'injecter l'actine pour permettre à StxB de pénétrer dans le tube nouvellement tiré.

Alors que, sur liposome, il a déjà été montré que la polymérisation de l'actine était suffisante à la scission des tubes de StxB, avec le mélange biochimique utilisé et dans nos conditions mécaniques nous ne sommes pas parvenus à reproduire systématiquement cette scission. Sur une dizaine d'expériences seules 3 ont abouti à la scission du tube comme indiqué (FIG :6.12).

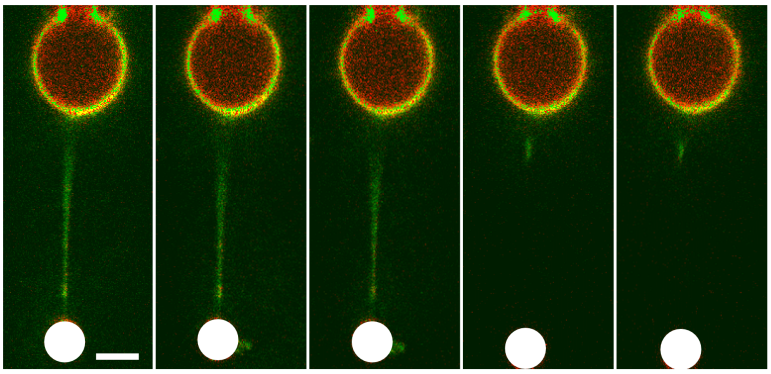


FIGURE 6.12 – Scission d'un tube de membrane. L'actine (en vert) polymérise sur la surface extérieure du liposome qui contient la toxine de Shiga (en rouge). Dans le cas présenté, plusieurs minutes après avoir démarré la polymérisation le tube de membrane est coupé. 1 image/3 min. Echelle 3 µm.

Une des différences majeure, présente dans notre système est la tension de membrane. En effet, afin de maintenir le liposome il est aspiré par une micropipette ce qui a pour effet d'augmenter la tension de la membrane. L'idée est donc maintenant de tirer des tubes de membrane à très faible tension sans faire intervenir de micropipette d'aspiration. Le protocole que l'on a mis au point permet, à l'aide d'une multi-pince optique, de tirer des tubes de membranes extrêmement fluctuants, à partir d'un liposome, et peu tendus sans avoir besoin d'une bille recouverte de streptavidine ou de micropipette. On utilise la différence d'indice optique de la membrane pour la piéger et la tirer.

6.3.2 En présence de la myosine II

Nous avons aussi essayé d'injecter de la myosine II sur des tubes de membrane recouverts d'un réseau d'actine. Dans ces expériences, le liposome constitué à 1% de PEG-biot et 99% d'EPC est formé par électroformation. Une fois le tube extrudé l'actine est injectée pour former un réseau à sa surface. Ce n'est seulement qu'après avoir formé un réseau sur le tube que l'on injecte de la myosine II.

Dans ce cas, la myosine tire sur le réseau et finit par dénuder le tube sans engendrer de scission (FIG :6.13). On observe sur le kymographe que l'actine et la myosine se translatent ensemble le long du tube de membrane (FIG :6.13,B). Le réseau d'actine est principalement aligné par rapport au tube et très peu réticulé perpendiculairement à ce dernier. La force exercée par la myosine aura donc tendance à rapatrier les filaments parallèles au tube plutôt qu'à pincer le tube de membrane et engendrer sa scission. On observe deux types de comportements : une contraction de l'actine par la myosine puis un déplacement de l'ensemble.

6.4 Conclusion

Les premiers résultats présentés dans ce chapitre permettent de quantifier, pour la première fois, l'effet de la dynamique de polymérisation sur un tube de membrane. En plus de contrôler toute la biochimie ce montage expérimental nous permet aussi de maîtriser la géométrie du tube que l'on extrude. Nous avons ainsi pu montrer, par une mesure de force, que l'actine seule stabilise les tubes de membrane mais n'est pas suffisante pour les couper. Les expériences sur tirage de tubes sont déjà utilisées pour caractériser les mécanismes de scission membranaire faisant intervenir, en général, une protéine. On montre, à travers cette étude, que l'on peut complexifier ces systèmes en ajoutant la polymérisation de l'actine. En effet, des mesures de force ont déjà été effectuées en présence du cortex d'actine et de la toxine de Shiga ou bien de la myosine II. Par ailleurs, de ces expériences supplémentaires, on déduit qu'il est possible d'utiliser des liposomes électroformés ou obtenus par émulsion inverse ce qui multiplie le champ des possibilités dans la caractérisation de systèmes *in vitro* dans cette géométrie.

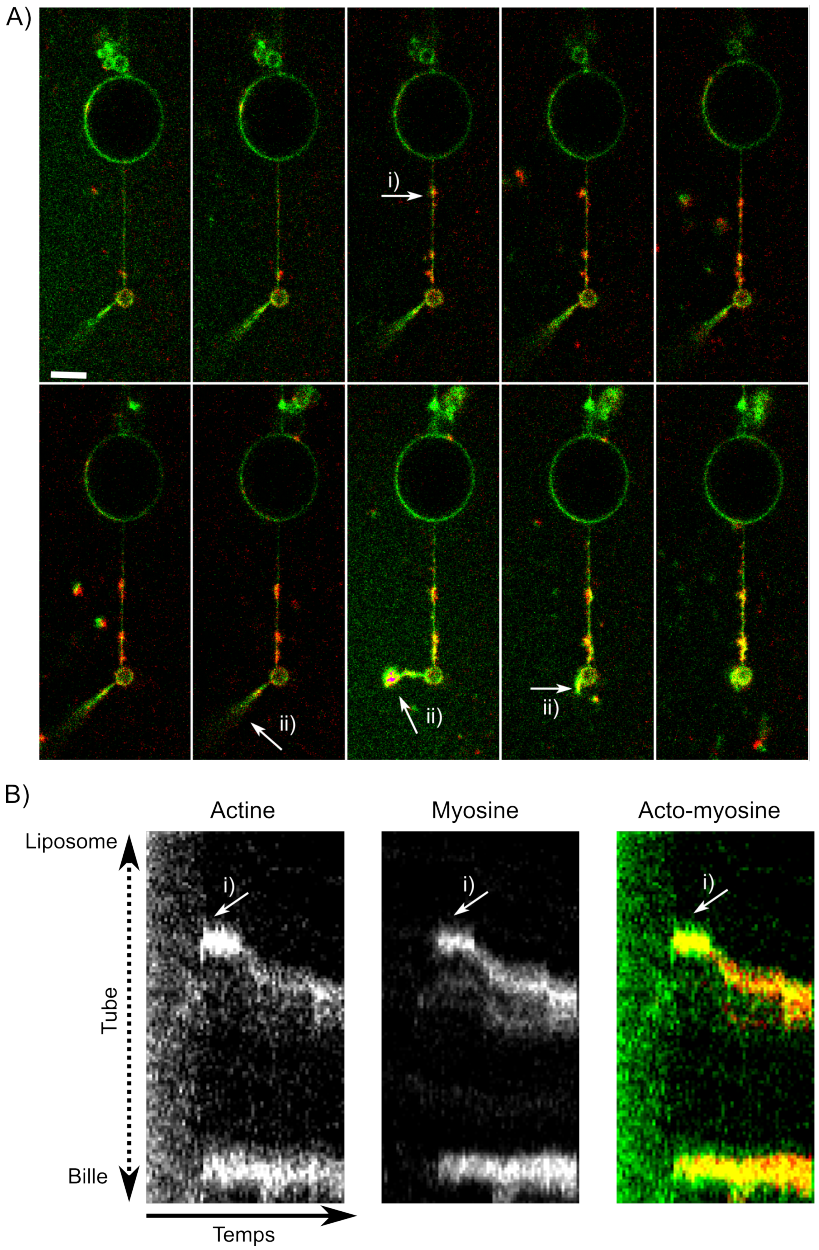


FIGURE 6.13 – A) Injection de myosine II (en rouge) sur tube de membrane recouvert d'un réseau d'actine (en vert). B) Kymographe le long du tube de membrane pour l'actine, la myosine et la superposition des deux. Lorsque la myosine interagit avec le tube, l'actine qui est initialement présente sur tout le tube est condensée au niveau de la myosine. i) A-B) Colocalisation, au cours du temps, des zones denses en actine avec la myosine qui se déplacent le long du tube. ii) Contraction d'un filament d'acto-myosine lié à la bille. Image en microscopie confocale, échelle 5 µm.

Conclusion générale

En entrant en thèse j'ai commencé à me former aux techniques de fabrication des liposomes. On ne s'en doute pas au premier abord, mais faire une double émulsion et obtenir un liposome est loin d'être évident. On est content de former son premier liposome et de l'observer au microscope à contraste de phase, mais un seul liposome ne suffit pas, en général. Il faut ensuite augmenter son rendement et une fois que l'on a un beau tapis de liposomes devant les yeux, les choses ne font que commencer. L'équipe de Cécile Sykes s'intéresse à l'effet de l'actine sur le changement de forme des membranes. Aussi, j'ai ajouté des protéines aux membranes nues. Alors que l'on pense enfin maîtriser l'émulsion inverse, le simple ajout d'une protéine ou d'un nouveau lipide nous rappelle que rien est jamais acquis, et nous voilà repartis, à nouveau, à l'étape d'optimisation du protocole. L'électroformation, quant à elle, à l'avantage de récompenser plus rapidement tout expérimentateur avec ces hauts rendements et sa facilité d'utilisation.

Après les liposomes, vient le temps des protéines. Là aussi il a fallu de la patience. Mais l'étude de la dynamique de polymérisation demande, en plus de connaissances bibliographiques, une expertise sur plusieurs protéines : l'actine, la CP, la profiline, le complexe Arp2/3 et son activateur, la myosine II, la phalloïdine, les fluorophores. C'est une étape nécessaire qui permet de comprendre la composition des tampons, l'ordre d'intervention des protéines ainsi que leurs interactions. Ce n'est qu'avec ces informations en tête que j'ai pu commencer à créer mes propres protocoles.

Parallèlement à ces deux premiers points, je me suis formé à l'utilisation d'un montage optique. Après un peu plus d'un an, avec l'aide de Matthias Bussonnier et Timo Betz, nous avons même mis au point un tout nouveau montage, équivalent du couteau suisse pour un montage optique. En effet, sur le même microscope nous avons ajouté une pince optique, une multi-pince optique, un détecteur de position, une diode quatre cadrans, un spinning disk à trois couleurs, deux micromanipulateurs (l'un hydraulique et l'autre contrôlé par un piezo), des contrôleurs de pression pour les micropipettes et ce n'est pas fini puisqu'il est prévu d'y ajouter le contraste de phase, un laser UV et un contrôleur de température.

Toutes ces notions, acquises durant ma thèse, sont seulement des pré-requis nécessaires pour étudier et comprendre les changements de formes cellulaires engendrés par la dynamique de polymérisation du cytosquelette d'actine à travers les différentes études que j'ai présentées dans ce manuscrit.

Dans notre première étude, Nous avons approfondi la caractérisation d'un système utilisé comme bioréacteur ou pour reconstruire un cortex d'actine à la membrane interne d'un liposome. Nous avons quantifié l'incorporation de l'α-hémolysine à la membrane de liposomes. Nous avons aussi pu montrer, à l'aide d'une mesure optique non invasive, que la densité surfacique de pores dépend du type de lipides utilisés pour former le liposome, et non pas de la méthode de préparation de ces derniers. En effet, malgré la présence d'huile entre les deux feuillets d'un liposome formé par émulsion inverse, la quantité d'α-hémolysine sur ces liposomes est la même que sur ceux formés par électroformation. De plus, la méthode d'acquisition utilisée, à partir d'une pince optique à très faible puissance, nous permet également de suivre dynamiquement les échanges entre le milieu extérieur et intérieur du liposome. Ce système peut aussi servir à caractériser les réactions qui ont lieu au sein des bioréacteurs sans les détruire.

C'est en présentant mes travaux sur le déclenchement de la polymérisation de l'actine à la surface de tubes de membrane que le projet sur l'endophiline-A2 est apparu dans mes travaux de thèse. A ce moment François-Henri Renard, de l'équipe de Ludger Johannes étudiait *in vivo* le rôle de l'endophiline-A2 dans la scission membranaire indépendante de la clathrine. C'est pour répondre à cette question que nous avons mis au point un nouveau système *in vitro* basé encore une fois sur le liposome. Il s'agit d'une étude dans laquelle la technique de l'émulsion inverse montre tous ses avantages. Elle nous a permis de mettre au point un protocole de formation de liposomes à membrane asymétrique. Nous avons ainsi pu mimer, de chaque côté d'une membrane modèle, une interaction spécifique avec la toxine de Shiga d'un côté et l'endophiline-A2 de l'autre côté. Nous avons alors montré que l'endophiline-A2, qui est une protéine à domaine BAR, ne peut ni induire de déformation membranaire, ni de scission, mais est capable de changer la morphologie de déformations pré-existantes. L'aspect de ces tubes, en présence de l'endophiline-A2, nous permet même de mettre en évidence son effet "scaffolding". Cependant aucun événement de scission membranaire n'a été observé dans nos conditions biochimiques et sous force nulle.

Pour les études menées sur la contraction d'acto-myosine, nous avons utilisé le liposome afin de mimer les déformations membranaire. Le système minimaliste mis au point permet de décomposer, de manière totalement indépendante, les forces provenant de la polymérisation de l'actine de celles provenant des moteurs moléculaires. Nous avons ainsi mis en évidence que la contraction et la déformation sont contrôlées par la densité du réseau d'actine et plus particulièrement par la longueur des filaments qui le constituent. Afin de quantifier l'évolution de la tension corticale, lors de la contraction d'acto-myosine, nous avons développé un autre système biomimétique basé sur l'adhésion de deux liposomes. Alors qu'*in vivo*, le terme de tension corticale englobe à la fois la tension de la membrane et la tension du cytosquelette, notre modèle permet de dissocier les deux et d'étudier uniquement l'augmentation de la tension

due au cortex d'acto-myosine. Dans la littérature, les variations de tensions que l'on peut trouver, lorsque l'on vient perturber le cortex cellulaire, sont de l'ordre de 2. Notre système est capable de répliquer une augmentation de tension du même ordre de grandeur, il possède déjà les caractéristiques biochimiques et mécaniques faisant de lui un bon candidat pour l'étude *in vitro* de la tension corticale. Ce nouveau modèle permettra de caractériser les effets d'autres types de myosines, tout en jouant sur les paramètres biochimiques. Dans l'avenir, ce système sera utiliser pour faire un saut entre la cellule et le tissu en formant, non pas un doublet, mais un tapis de liposomes.

La dernière étude, qui était initialement mon sujet de thèse principal, consiste à caractériser l'effet de la dynamique de polymérisation de l'actine sur des structures tubulaires. Il ne s'agit, pour le moment, que de résultats préliminaires basés sur des expériences de tirage de tube. Nous avons montré, par une mesure de force, que l'actine seule stabilise les tubes de membrane mais n'est pas suffisante pour les couper. On montre aussi, que l'on peut complexifier encore ces systèmes puisque des mesures de force ont déjà été effectuées en présence du cortex d'actine et de la toxine de Shiga ou bien de la myosine II. Ces premières expériences montrent qu'il est possible d'utiliser des liposomes électroformés ou obtenus par émulsion inverse, ce qui multiplie le champ des possibilités pour de futures études. Dans la continuité de ce projet et de celui sur l'endophiline-A2, il serait intéressant de regarder, à l'aide de ce système minimaliste, l'effet de la polymérisation de l'actine, sur les structures tubulaires stabilisées par l'endophiline-A2.

Annexe A

Contribution Article 5

A.1 Article 5 : Mechanical detection of a long range actin network emanating from a biomimetic cortex

Matthias Bussonnier†, Kévin Carvalho†, Joël Lemière, Jean-François Joanny, Cécile Sykes, Timo Betz

† : égale contribution.

Biophysical Journal (2014)
107(4) : 854-862

Biophysical Journal Volume 107 August 2014 854–862

Article

Mechanical Detection of a Long-Range Actin Network Emanating from a Biomimetic Cortex

Matthias Bussonnier,[1,2,3,4] Kevin Carvalho,[1,3,4] Joël Lemière,[1,2,3,4] Jean-François Joanny,[1,3,4] Cécile Sykes,[1,3,4] and Timo Betz[1,3,4,*]

[1]Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France; [2]Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; [3]Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 06, UMR 168, Paris, France; and [4]Centre National de la Recherche Scientifique, UMR168, Paris, France

ABSTRACT Actin is ubiquitous globular protein that polymerizes into filaments and forms networks that participate in the force generation of eukaryotic cells. Such forces are used for cell motility, cytokinesis, and tissue remodeling. Among those actin networks, we focus on the actin cortex, a dense branched network beneath the plasma membrane that is of particular importance for the mechanical properties of the cell. Here we reproduce the cellular cortex by activating actin filament growth on a solid surface. We unveil the existence of a sparse actin network that emanates from the surface and extends over a distance that is at least 10 times larger than the cortex itself. We call this sparse actin network the "actin cloud" and characterize its mechanical properties with optical tweezers. We show, both experimentally and theoretically, that the actin cloud is mechanically relevant and that it should be taken into account because it can sustain forces as high as several picoNewtons (pN). In particular, it is known that in plant cells, actin networks similar to the actin cloud have a role in positioning the nucleus; in large oocytes, they play a role in driving chromosome movement. Recent evidence shows that such networks even prevent granule condensation in large cells.

INTRODUCTION

The actin cytoskeleton plays a major role in cellular mechanics (1), force generation (2), and cell motility (3). Its mechanical properties have been extensively studied in the past decades (4). The detailed characterization and modeling of the actin cytoskeleton has proven to be a complex task, mainly due to the different structures formed by the actin biopolymer in cells. A major experimental approach to understand the architecture and detailed properties of the actin cytoskeleton is to reconstitute the structures commonly found in cells using purified components (5–8). Such controlled in vitro studies gave detailed insights into the mechanical properties of cytoskeletal structures like actin bundles (9), actin stress fibers (10), and cortical actin networks (7,11).

Of particular importance is the mechanical contribution of the actin cortex, which provides a mechanical barrier supporting the plasma membrane against extracellular forces, but also acts as a steric obstacle for intracellular organelles. The actin cortex in cells was estimated to extend over a thickness of a few hundred nanometers underneath the cell membrane (12,13). However, actin structures connected with the actin cortex appear to be key elements for organelle positioning in plant cells (14,15) and nuclear positioning in oocytes (14,16). Moreover, nuclear actin dynamics is involved in the movement of chromosomal foci in large cells like oocytes (17). A recent study shows that such networks can even prevent the condensation of nuclear droplets in large cells (18). How these actin networks could be connected to the cortex, and can we envision that they could emanate from the actin cortex, are the questions we address here.

How this cortical actin network is nucleated at the membrane is still a debate (19). Although fluorescence techniques did not allow detection of the presence of the Arp2/3 complex and formins as a nucleating agent of the actin network at the membrane (20), the branched structure that is observed under the plasma membrane hints for a contribution of Arp2/3 (12). Therefore, it is important to understand how networks produced by the Arp2/3 complex branching mechanism can impact cell mechanics and behavior. Such a branched and entangled actin network can be reproduced at the surface of beads covered with an activator of the Arp2/3 complex (11). The thickness of such an actin network was detected by epifluorescence microscopy and defined as the distance of the bead surface from the half-maximum intensity position along a radial profile. However, in these experiments, the drop of fluorescence away from the bead is not abrupt as shown in Fig. 1, *A* and *B* (11). This is what we explore here, by characterizing the mechanical and structural organization of this actin network further away from the zone detected by fluorescence. Our experimental system, based on the high force sensitivity of optical tweezers (see Fig. 1 *C*), allows detection of a mechanically relevant actin network that is inaccessible to direct visualization. This actin

Submitted March 28, 2014, and accepted for publication July 7, 2014.

*Correspondence: timo.betz@curie.fr

Matthias Bussonnier and Kevin Carvalho contributed equally to this work.

Editor: Laurent Blanchoin.

© 2014 by the Biophysical Society

0006-3495/14/08/0854/9 $2.00

http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.008

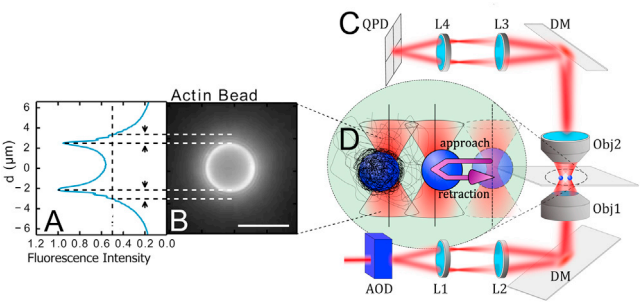


FIGURE 1 Sketch describing the experimental situation: (*A*) Normalized intensity profile of the fluorescent actin cortex shown in panel *B*, taken along the bead diameter. *Arrowheads* indicate Gel thickness measured as the half-maximal intensity of the epifluorescence signal. (*B*) Fluorescence image of a 4.3 μm actin bead, 25 nM Arp2/3, 10 nM CP after 30 min. Bar is 5 μm. (*C*) To probe the mechanics of the actin cloud, we use multiplexed optical tweezers generating two traps. A 1W infrared fiber laser ($\lambda = 1064$ nm; IPG Photonics, Oxford, MA) is steered by two acousto-optical deflectors (*AOD*s) and multiplexed by time-sharing. The resulting beams are imaged in the back focal plane of a water immersion objective (*Obj1*, 60×, $NA = 1.2$), by a twofold magnification telescope (with focal measurement of the L_x lenses being $f_{L1} = 10$ cm, $f_{L2} = 20$ cm). The light is coupled in the optical path of a model No. IX71 microscope (Olympus, Melville, NY) by a dichroic mirror (*DM*). After interaction with the beads, the light is collected by a water immersion objective (*Obj2*, 40×, $NA = 0.9$) and the back focal plane of Obj2 is imaged onto a quadrant-photodiode (*QPD*) via two lenses ($f_{L3} = 6$ cm, $f_{L4} = 3$ cm). (*D*) The lasers trap the actin bead (*left*) and the probe bead. During the experiments, the probe bead is approaching the actin bead and moved from an initial position (*transparent*, *right*) to a final position at a velocity v, resting 3 s at the closest proximity (*middle*) and retracting back to the original position (movement indicated by the *purple arrow*). The displacement of the two beads from their respective trap center (marked by a *straight line*) is recorded by the QPD during the whole time. Optical forces are calculated using the calibrated trap stiffness.

network emanates from the epifluorescence-visible part, which represents only 1/10 of the full network size, and opposes resistance to indentation, thus revealing its important mechanical role.

The originality of our work is that we show the Arp2/3 complex can give rise to a mechanically resistant actin cloud that spans over distances larger than the dense and branched network close to the Arp2/3 activation. We characterize its mechanical parameters and show that this actin cloud allows sustaining forces able to displace objects on a cellular length-scale. Our findings suggest that even a few filaments that may emanate from the actin cortex can lead to sufficient resistance and can generate forces that may explain the role of actin in organelle positioning within the cell. Similar filaments have been recently described to emanate from a nuclear actin cortex in starfish oocytes (21).

MATERIALS AND METHODS

Proteins

Products are obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless stated otherwise. Actin and the Arp2/3 complex are purchased from Cytoskeleton (Denver, CO), and used without further purification. Fluorescent Alexa-488 actin is obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Capping Protein (CP), profilin, and pVCA are purified as previously described in Bernheim-Groswasser et al. (5) and Paluch et al. (22). Monomeric actin containing 10% molar of labeled Alexa-488 actin in G-Buffer (2 mM Tris, 0.2 mM CaCl2, and 0.2 mM DTT, at pH 8.0) at a concentration of 40 μM is obtained by keeping the solution one night on ice at 4°C before experiments.

Bead coating

Carboxylated polystyrene beads (Polysciences, Philadelphia, PA) of 4.34 ± 0.239 μm (standard deviation, SD) diameter were used for actin and probe beads.

Probe beads

Polystyrene beads are incubated for 20 min at 20°C under agitation with 10 mg/mL BSA at room temperature for 30 min in the working buffer (pH 7.4, 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM MgCl2, 0.1 mM CaCl2, 1.8 mM ATP, and 1 mg/mL BSA), and stored for a few days at 4°C.

Actin beads

Polystyrene beads are first incubated for 20 min at 20°C under agitation with 2 μM pVCA and stored in working buffer (as above) for the day. Then they are placed in the polymerization mix, which is a solution of 4 μM G-actin, 12 μM profilin, and 25 nM of Arp2/3 complex and various concentrations of CP (0–50 nM) in the working buffer. A quantity of 15 μL of this mix is sealed between coverslips.

Experimental procedure and data analysis

For the bead approach experiments, the pVCA-coated beads, which will later polymerize actin, are mixed with BSA-passivated probe beads. Polymerization of actin on the beads is triggered by adding the bead mixture to the polymerization mix. Approximately 15 μL of the mix is sealed between two coverslips and observed in an inverse microscope (model No. IX71; Olympus, Melville, NY) using a 60× water immersion objective ($NA = 1.2$). Optical tweezers are used to trap and manipulate the beads in three dimensions by the gradient forces of a focused infrared fiber laser ($\lambda = 1064$ μm, YLP-1-1064; IPG Photonics, Oxford, MA). The *XY* position and trapping forces are controlled by acousto-optical deflectors (AA-Opto Electronic, Orsay, France). Multiple traps are realized by time-sharing where the laser is switched within ≈6 μs between two positions, while resting 20 μs on each position. Position and force applied on each bead are measured using a quadrant photodiode (QPD) positioned in the back focal plane of the condenser (Fig. 1).

The trap stiffness is calibrated using the power spectral density of trapped beads (23), and determined to be 34 pN/μm with the laser power of 119 mW as used during all experiments. The signal from the QPD is recorded with a sampling rate of 500 kHz using a commercial data acquisition card (NI PCIe-6363; National Instruments, Austin, TX), and processed using the software LABVIEW (National Instruments) and the software MATLAB (The MathWorks, Natick, MA). Data acquisition and trap positioning are synchronized to recover the individual data for each bead. The signal from the QPD is converted to both the force exerted by the trap on the bead, and the bead position in the trap, thanks to previous calibration.

To measure the viscoelastic properties, we perform a force-indentation experiment. An actin and a probe bead are selected, trapped, and checked for compromising adhesion to the upper or lower coverslip. The presence of the actin network is confirmed using fluorescence microscopy (200-W mercury lamp; Osram, Munich, Germany). All measurements are made on the dynamically polymerizing system, before symmetry breaking of the actin network.

To avoid too-strong forces on the beads, which could push them out of the trap, single approach/retraction cycles were done while decreasing the minimal approach distance stepwise by 0.2–0.5 μm until the maximum

force reached 8–10 pN. In these conditions, the experimental protocol was stable and multiple consecutive approach experiments were done.

For the approach phase, the three fit parameters (α, β, and δ) are estimated using a Levenberg-Marquardt algorithm as provided by MATLAB. To facilitate stability in the fit algorithms, distances are expressed in micrometers and forces in pN.

Phenomenological fit of retraction curve

To fit the retracting part, we introduce the function $A(d) = R\beta(d_c)^{\alpha}$ with $R: \quad 0 \leq R \leq 1$, which corresponds to the elastic part of the actin-cloud, and is hence the discussed forces-distance curve (Eq. 2) scaled with the relaxation R, as described in the main text (see Fig. S4, *dashed line* in the Supporting Material, and Eq. 9). $A(d)$ is fully determined from the approach and the relaxation data. For the plot in the retraction phase, we use the difference between the actual data and the expected elastic forces $A(d)$ to estimate the force that results from the actin cloud that has closed behind the bead. This is attributed to a second power-law function $B(d) = -Z(d_c)^{w}$ (see Fig. S4, *red*), which is fitted to the difference between the measured force during the retraction and $A(d)$ for the long distance (after force minimum is when the retraction phase was reached).

To determine the curve plotted later in Fig. 4, we smoothly converge from $A(d)$ to $B(d)$ by using a the smoothing function $S(x) = \int_{\mathbb{R}}(1-(x-t)^2) \times L(t)dt$, which corresponds to a convolution between the projected bead area and a linear ramp function L that is 0 for $t \leq 0$ and 1 for $t \geq 1$. The final model then reads:

$$F(d) = A(d) \times (1 - S(d)) + (A(d) + B(d)) \times S(d). \tag{1}$$

RESULTS

Bead system

Polystyrene beads of 4.3 μm diameter are first coated with a nucleation-promoting factor, pVCA, which is the VCA domain of N-WASP with the addition of a proline-rich region (24). Beads coated with pVCA are then placed in the mix of purified proteins, containing 25 nM of the Arp2/3 complex, 4 μM actin, 12 μM profilin, and various amounts of CP. In these conditions, a network of actin filaments grows from the bead surface. In the following, these beads, once covered with their actin network, are called "actin beads" (Fig. 2 *A*).

In the absence of CP, actin filaments grow with their barbed ends away from the surface (24). The presence of CP limits the filament growth. In a spherical geometry of a bead, a stress builds up because new branches are formed at the surface of the bead, and symmetry breaks in a concentration range of CP from 15 to 35 nM (11,25).

The choice of a bead diameter of 4.3 μm allows us to perform measurements on an actin network that is homogeneous in the angular direction—hence, before the appearance of heterogeneities that are a signature of symmetry breaking (Fig. 1 *B*). A characteristic symmetry-breaking time for those beads is indeed ~20 min (11). Because our

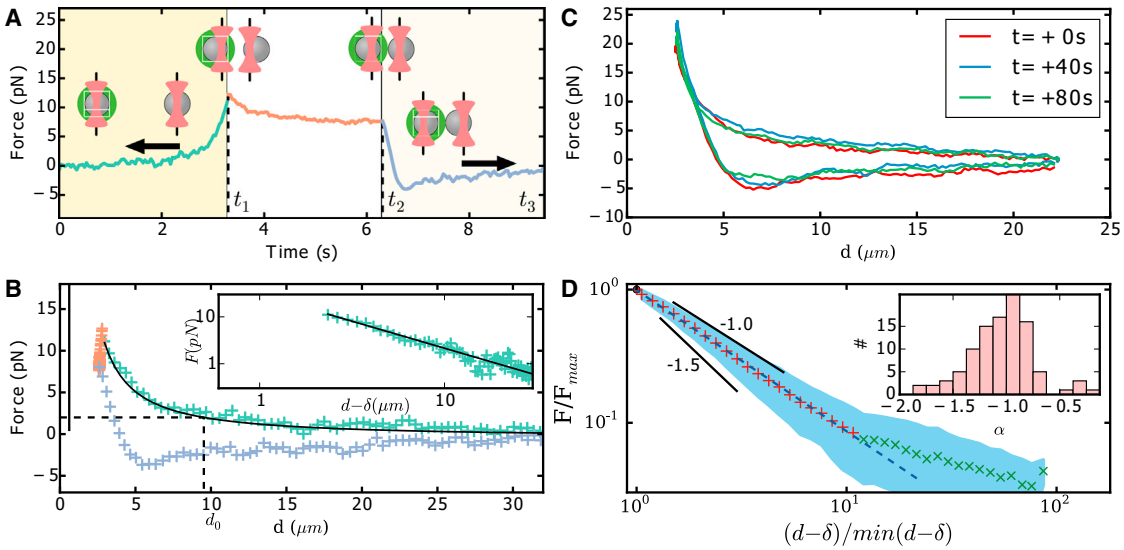


FIGURE 2 (*A*) Force of an actin bead as a function of time in the presence of 30 nM CP. The values t_1 and t_2, respectively, correspond to the beginning of the relaxation and retraction phases. Here, the sample is measured 12 min after adding actin to the bead mix. Color of the points marks the different phases: approach (*green*), relaxation (*red*), and retraction (*blue*). (*B*) Force on an actin bead as a function of the distance d between bead surfaces of the data presented in panel *A*. The zero force is fixed by the average of force at a large distance. The value d_0 is the distance at which the mean force is higher than the SD measured for the resting bead (before the approach). We use this distance, d_0, as the actin cloud size for the presented analysis. However, it should be noted that this measure may depend on the measurement method and the size of the probe beads. The color code used corresponds to panel *A*. The sample was measured 17 min after adding actin to the bead mix. (*Straight black line*) δ, the distance at which the force extrapolated by the fit would be infinite. (*Inset*) Power-law fit of the approach (*solid line*) and log-log representation. Examples of graphs *A* and *B* for different amounts of Capping Protein are available in Fig. S5, Fig. S6, and Fig. S7 in the Supporting Material. (*C*) Repeated approach-retraction experiments (three out of eight shown) give reproducible data. The example shown was acquired under 10 nM CP concentration. (*D*) Log-log representation of the rescaled experimental data. (*Red* and *green crosses*) Mean values. (*Solid blue area*) Average plus/minus SD for each averaged bin. (*Blue dashed line*) Linear fit of the data, $(d-\delta)/(d-\delta)_{\min} < 10$, and slope is -1.06. Slopes of -1,-1.5 are represented as visual guides. (*Inset*) Distribution of power-law exponent values obtained for each approach experiment for all CP concentration values ($n = 103$). We excluded 24 experiments out of 127, which gave fit results with negative and nonphysical value for δ.

experiments are performed before symmetry-breaking, both the actin gel and the actin cloud are still growing, and no steady state has been reached. However, as previously investigated (11), the growth velocity is small, with ~0.1 μm/min, so that during the 2 min required for the approach experiments the actin-gel growth of ~200 nm is negligible compared to the typical distances of ~10 μm studied in this work.

Experiment description

Using optical tweezers, the probe bead is moved toward an actin bead. The forces on each bead are monitored, as shown in Fig. 1 *C*. Time-shared optical tweezers are used to trap the probe- and actin-beads (see Materials and Methods for more details (26)). The displacement of each bead from its trap center is recorded using a QPD, as shown in Fig. 1 *C*. For further analysis, we exclusively use forces determined from the stationary trap that holds the actin bead to avoid systematic errors that might arise from the trap displacement. The absence of interaction between bead and glass coverslip is probed before each experiment by moving it in all directions using the tweezers. A typical experiment starts as follows: the distance between traps is at least set to 20 μm, and beads are positioned at the trap centers. Then, the probe trap approaches the actin bead at a constant velocity of $v = 10$ μm/s ($0 \leq t \leq t_1$; Fig. 2 *A*, *left*). During this process, as soon as the actin bead feels the force exerted by the probe bead, it becomes off-centered in its trap (Fig. 2 *A*, $t \lesssim t_1$).

The approach phase is followed by two other phases, a relaxation phase ($t_1 < t < t_2$; Fig. 2 *A*, *center*, *white background*), and a retraction phase ($t_2 < t < t_3$; Fig. *A*, *right*, *light yellow background*). During the retraction phase, the probe bead returns to its initial position with the same absolute velocity of 10 μm/s as in the approach phase. The duration of the relaxation phase ($t_2 - t_1 = 3$ s) is chosen to be long enough to allow relaxation to happen, and short enough for actin polymerization not to change the properties of the network. The time-dependent force on the actin bead (Fig. 2 *A*) is converted into a force-distance curve as shown in Fig. 2, *B* and *C*, where d is the distance between the surfaces of the actin bead and the probe bead. The force distance curve Fig. 2 *B* reads as follows: i) ($t \leq t_1$) the force between beads starts from an asymptotic zero value at long distance and increases as the distance decreases (*green points*). ii) ($t_1 \leq t \leq t_2$) the probe bead stops and relaxation occurs. During the relaxation, the force decreases with a very little distance decrease (*red points*, *top left* in Fig. 2 *B*). iii) ($t_2 \leq t \leq t_3$) the force decreases, becomes negative, and eventually reaches asymptotically zero again when distance increases (*blue points*).

Those curves are repeatable and show only small changes if multiple approach-retraction cycles are probed (see Fig. 2 *C*). Previous experiments suggest that for frequencies >0.1 Hz, viscous relaxation becomes comparable to the elastic properties (27). To check the importance of stress relaxation during the approach phase, we verify that the probe trap velocity did not affect the force-distance curves, by performing experiments at variable velocities ranging from 5 to 30 μm/s (see Fig. S1). These experiments did not show any striking differences in the recorded measurements; hence, for the analysis of the approach phase, we use an elastic model.

EXPERIMENTAL OBSERVATIONS

Approach phase

The bead system provides a way to reconstruct actin cortices in vitro. Moreover, these reconstituted systems can be manipulated to investigate three-dimensional mechanical properties of a biomimetic actin cortex in experimental conditions inaccessible to other microscopy techniques that are typically used to investigate single actin filament dynamics, like total internal reflection. Optical tweezer and force measurements on the bead allow us to precisely probe for the actin network emanating from a bead in a three-dimensional environment. To approximate the size of the actin cloud, we determine the distance d_0 (Table 1, Fig. 2 *B*, *dotted lines*) where the forces on the probed bead become higher than the experimental noise of the force detection (2 pN). The found values for d_0 remain large compared to the fluorescent actin gel thickness. Indeed, the probe bead already feels the presence of actin filaments at a distance from 13 to ~4 μm (Fig. 1, *A* and *B*; Table 1). This distance depends on CP concentration (Table 1), but is always much larger than 1 μm. This has been established as an upper estimation of the actin network thickness e, previously measured as the distance of half-maximum fluorescence intensity (11) and Fig. 1 *A*.

As the bead distance decreases, the force gradually increases, until the trap stops at the minimal displacement distance. The force-distance data are fitted by a power-law with fit parameters β, α, and δ (Fig. 2, *A* and *B*),

$$F(d) = \beta \times (d - \delta)^{\alpha}, \tag{2}$$

where we obtain a high fit quality measured by a median $R^2 = 0.97$. Because the power-law exponent, α, is found to be negative (Table 1), δ corresponds to the offset distance between bead surfaces at which the force would diverge (*vertical black line* in Fig. 2 *B*).

We experimentally find a negative power-law exponent close to -1 with a statistical distribution of $\langle\alpha\rangle = -1.10 \pm 0.38$ ($n = 103$, mean $\pm$ SD) for all CP concentrations probed (Fig. 2 *D*, *inset*).

This inverse relation hints for a far-reaching network, or actin cloud, which is mechanically evidenced here. In our experiments, it is detectable over distances that are larger than the fluorescence-estimated thickness of ~1 μm (see Movie S1 in the Supporting Material).

Due to the scale invariance of the power-law, we can collapse all 103 experimental curves into a single master curve by normalizing the force with the point of maximal force ($F_{\max}$) reached at t_1, and the distance between bead surface at the minimal approach (d_{t1}, Fig. 2 *D*). This rescaling procedure allows us to determine the power-law exponent of all averaged data curves to be ($\alpha_{rs} = -1.06$), which confirms the -1 exponent.

Nonlinear elastic modulus

To determine the Young's modulus from the force-distance curves, we use its definition as given by Hooke's law: $E = \sigma/u$, where $\sigma = F/(\pi R^2)$ is the stress on the projected bead surface, R is the bead radius, $u = (d_c - x)/d_c$ is the strain where we define $d_c = (d - \delta)$, and x is the experimentally controlled bead position for the small deformations. Hence $du = -dx/d_c$, where the minus sign reflects the choice of the coordinate system for the deformation, which has to be consistent with the direction of the force to ensure a positive elastic modulus. Here we study the situation in which a predeformation of the gel of d_c is applied, and then we apply a stress σ and strain u when displacing the probe bead by a small distance. In such a situation, the global Young's modulus as function of d_c reads $E(d_c) = (d\sigma/du)|_{dc}$. The deformation-dependent Young's modulus can hence be expressed as the derivative of the force, with respect to the deformation at the distance d_c, to yield

$$E(d_c) = -\frac{d_c}{\pi R^2} \times \left(\frac{dF}{dx}\right)\bigg|_{x=d_c}, \tag{3}$$

$$= E_0 \times d_c^{\alpha}, \tag{4}$$

where $E_0 = -\alpha\beta/(\pi R^2)$. In this expression, we use the fit function of Eq. 2 to calculate the derivative. Interestingly, using the strain at a position d_c gives rise to the same power-law between the nonlinear Young's modulus and the measured force. It should be noted that, experimentally, we can only access the average mechanical properties between the probe- and the actin bead. Hence, all reported values present mean values of the material between these two beads. The discussed model describes the reported mean values, and assumes an effectively averaged Young's modulus. Here $E(d_c)$ is then this global Young's modulus that measures the material properties of the actin cloud that is confined between the two beads. These values (Table 1) are three orders-of-magnitude smaller than the elasticity of the actin gel generated from an Arp2/3-activated bead (known to be ≈ 1 kPa (28)). This large difference in rigidity might explain why the actin cloud was not observed in previous mechanical measurements such as micropipette, microneedle deformation, or atomic-force microscopy indentation that were sensitive to large forces in the nanoNewton (nN) regime. However, such small moduli are commonly found in loosely entangled actin networks (27). It also shows that the actin cloud is of a fundamentally different network type, resulting in such a drastic change of mechanical properties compared to the dense actin gel found at the bead surface. Optical tweezers are the optimal measurement technique to determine such small elastic parameters.

TABLE 1 Listing of the fit parameters found for different CP concentrations

CP [nM]	0	10	30	50
N	13	29	31	30
α	-1.2 ± 0.1	-0.9 ± 0.2	-1.1 ± 0.2	-1.2 ± 0.5
β[pNμm]	24.3 ± 10.7	18.7 ± 8.1	16.9 ± 16.0	6.1 ± 5.9
δ[μm]	0.5 ± 0.6	2.2 ± 0.7	1.2 ± 0.6	1.0 ± 0.5
ν	0.1 ± 0.05	0.2 ± 0.06	0.1 ± 0.07	0.1 ± 0.2
$E_{1\mu m}$ [Pa]	1.93 ± 1.05	1.24 ± 0.78	1.39 ± 1.61	0.59 ± 0.76
ξ_0[nm]	310	397	350	376
d_0[μm]	8.6 ± 2.9	13.3 ± 2.4	6.5 ± 3.1	3.7 ± 6.3
l_f[μm]	10.8 ± 2.2	9.1 ± 5.5	2.5 ± 0.5	3.1 ± 3.8
Median (R^2)	0.982	0.989	0.936	0.850

N represents the number of data-points for each CP concentration. Exponent of the model α, prefactor in the model β, distance offset δ, and $E_{1\mu m}$ is the elastic modulus at a distance of 1 μm. The value ξ_0 is the average mesh size as calculated for an homogeneous network. The value ν is the Poisson's ratio. The value d_0 is the distance at which the average force is >2 pN. The viscoelastic model used also allows prediction of the average filament length l_f from the relaxation behaviors. The median R^2 values are given to quantify the fit quality for the different conditions.

Relaxation phase

In the 3 s resting phase, we observe that the beads move toward the center of their traps, corresponding to a force relaxation (Fig. 2 *A*, *central*) during which the beads get closer to each other (Fig. 2 *A*, $t = t_1$ and $t = t_2$). The force-drop during the relaxation is typically of 20% (see Fig. S3).

Retraction phase

We observe a rapid decrease of the force toward negative forces, leading to two different behaviors that may add up:

1. A general tendency is that the rapid drop of the force is followed by a slow force increase through an inflection point (Fig. 2 *B*, *lower curve*), and
2. In $\approx$25% of the experiments, we find evidence of rapid detachments that are identified by a sawtooth shape of the force-distance curve (see Fig. S2).

Irreversibility

An important finding is that the approach phase does not superimpose with the relaxation and retraction phases, which indicates dissipation of energy during a cycle of approach and retraction. Apart from the relaxation phase, a contribution to this dissipation is the negative force that is reminiscent of the sticky behavior similar to atomic-force microscopy indentation/retraction experiments.

Influence of Capping Protein (CP) concentration

Actin filament length is controlled by the amount of CP in the protein mix (24). To check the influence of the CP concentration on the actin cloud we analyze experiments at 0, 10, 30, and 50 nM CP. As shown in Fig. 3 and Table 1, the value of the power-law exponent α does not change significantly with CP concentration. In contrast, we find that the distance offset δ changes under variable conditions and the parameter β decreases fivefold when CP concentration increases from 0 to 50 nM.

DISCUSSION

Approach phase: interpretation of the power-law

To further investigate this power-law exponent (of $\simeq -1$), we model the deformation of the actin cloud by the established theory of semiflexible, entangled polymer networks (29–31). In the approach phase, we focus on the elastic properties quantified by the deformation-dependent Young's modulus $E(d_c)$ and neglect any viscous term, given that the force in this phase does not depend significantly on the approach speed. The Young's modulus E of semiflexible filaments is well studied and can be expressed as a function of filament contour length density ρ and the entanglement length L_e as $E = 2\cdot(1+\nu)\cdot 7\cdot k_BT\,\rho/(5L_e)$ (31). The prefactor is model-dependent and includes the transition from shear to Young's modulus using the Poisson ratio. Previous studies have investigated the nonlinear stiffening of actin gels for large deformations comparable to the presented approach protocol (32). For actin concentrations similar to the concentration used in our study, these previous experiments show that a linear description holds, and hence the proposed model should correctly describe the mechanics of the polymer network.

The entanglement length itself can be expressed as a function of density ρ and persistence length L_p as $L_e \approx L_p^{1/5}\rho^{-2/5}$ (31). For the general case of a compressible material, the only variable that might change under the strong deformation is $\rho \rightarrow \rho(d_c)$. Hence, we can express the Young's modulus as a function of density ρ that depends on the compression of the network, therefore noted $\rho(d_c)$:

$$E(d_c) = \frac{(1+\nu)\cdot 14\cdot k_BT}{5L_p^{1/5}} \times (\rho(d_c))^{7/5}. \quad (5)$$

Using the experimentally found power-law, Eq. 5 allows us to infer a relation for the density $\rho \propto d_c^{5/7\times\alpha}$. Using the scaling arguments that at the distance d_0, which corresponds to the undeformed actin cloud, the density is ρ_0, we can directly express $\rho\ (d_c) = \rho_0(d_c/d_0)^{\ 5/7\times\alpha}$. These changes in the density can be also used to estimate the Poisson's ratio of the actin cloud, which connects the distance-dependent density and the deformation by $\rho\ (d_c) = \rho_0(d_c/d_0)^{\ 2\nu-1}$. Hence, we infer for Poisson's ratio: $\nu = 1/2(1 + 5/7\alpha)$. Due to the definition of ρ that corresponds to the filament contour length per unit volume, we can determine the average mesh-size ξ_0 of the undeformed network by $\rho_0 = 1/\xi^2{}_0$. Combining these expressions then leads to

$$E(d_c) = \frac{(1+\nu)\cdot 14\cdot k_BT}{5L_p^{1/5}\xi_0^{14/5}d_0^{\alpha}} \times d_c^{\alpha}, \quad (6)$$

$$= E_0' \times d_c^{\alpha}. \quad (7)$$

To determine the expected mesh-size, we can set E_0 as found in Eq. 3, equal to Eq. 6:

$$\xi_0 = \left(-\frac{\left(2-\frac{5}{7}\alpha\right).k_BT\pi R^2}{5\alpha\beta L_p^{\frac{1}{5}}d_0^{\alpha}}\right)^{\frac{5}{14}}. \quad (8)$$

The resulting values of ξ_0 are listed in Table 1, which are ~0.3–0.4 μm. Such average values are consistent with other rheology experiments and have been described in Morse (31). Unlike previous studies of bulk actin networks that find a bulk Poisson ratio of 0.5 for actin gels formed at actin concentration of 21.5 μM (27), we find that the actin cloud can almost collapse under the applied forces, with approximated Poisson's ratio of 0.1–0.2. The difference may be explained by the lower actin concentration (4 μM) or by the geometrical arrangement of the actin network used in our experiments.

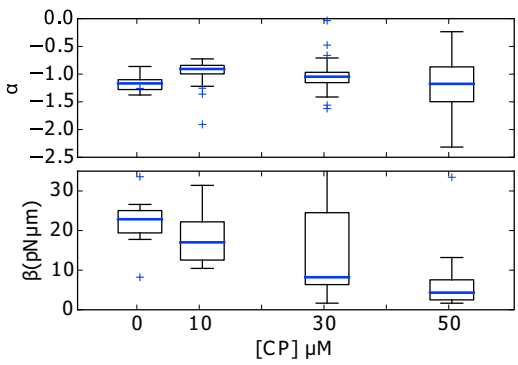


FIGURE 3 Distribution of power exponent α and prefactor β for different concentrations in CP (see Table 1). (*Box plot*, *blue line*) Mean; (*box limit*) first ($q1$) and third ($q3$) quartiles; (*whiskers*) extension to the most extreme data point within the 1.5 × ($q3$–$q1$) data range. None of the values of α are statistically different than the value for [CP] = 50 μM.

Approach phase: interpretation of distance offset δ

The third fit parameter in the power-law of Eq. 2 is δ, which marks the position at which the power-law diverges. Because the actin network around the bead is known to have an elastic modulus of $\approx$1 kPa (28,33), the forces

provided by our optical tweezers (maximum 30 pN) are unable to deform this network. This suggests that in our measurements, the actin network close to the bead acts as a rigid object, which in turn suggests interpreting δ as the thickness of the actin network defined by epifluorescence (Fig. 1 *B*). As shown in Table 1, δ decreases with increasing CP concentration. The determined values of $\approx$1–2 μm are consistent with previous measurements of the actin thickness e by fluorescence microscopy (11). This general dependence is not found in the absence of CP, where the system is in a completely different regime because the filament growth away from the bead is only limited by the amount of G-actin. Indeed, in the absence of Capping Protein, filaments grow mainly away from the bead (11), leading to the absence of symmetry breaking. Therefore, without CP it remains difficult to define an actin shell thickness. The increasing number of filaments growing away from the bead surface changes the overall structure of the gel, which does not allow interpretation of δ.

Relaxation phase

The apparent mechanical effect of the actin cloud shows a dominant elastic component, while the force-distance plot gives a significant dissipation marked by the hysteresis. The repeatable approach-retraction excludes a significant plastic deformation, like breakage of the filaments or rupture of the sparse actin network. To understand the relaxation and the retraction behavior, we further follow the approach inspired by Morse (31), and investigate the proposed relaxation function $\chi(t)$, which determines the time dependence of $E(t) = E \times \chi(t)$,

$$\chi(t) = \sum_{n,\mathrm{odd}} \frac{8}{n^2\pi^2} \exp\left(-n^2\pi^2 t/\tau_{\mathrm{rep}}\right), \tag{9}$$

where $\tau_{\mathrm{rep}} = l_f^2/D_{\mathrm{rep}}$. In this model, the relaxation is a sum of exponential decays with well-defined decay times for a reptation-dominated relaxation. The unknown parameters are the diffusion constant for filament reptation D_{rep} and the filament length l_f, which are combined in the single fit parameter (τ_{rep}). We limit the fit to the first 40 terms of the sum in Eq. 9, because the higher modes relax faster that can be observed with the experimental resolution. Such a sum of exponentials remains consistent with the common finding of a power-law behavior of the shear modulus in in vitro actin networks (27) and the relaxation behavior found in cells (34).

To check whether the resulting fit parameter gives realistic values, we estimate $D_{\mathrm{rep}} = k_{\mathrm{B}}T/(\gamma l_f)$, where $\gamma \approx 2\pi\eta_s/ln(\xi/d_f)$ is the friction coefficient per unit length that depends on the solvent viscosity η_s; the mesh-size ξ, which has been estimated in Eq. 8; and the filament diameter d_f. We can also use $\eta_s = 10^{-3}$ Pa $\times$ s, $d_f = 7$ nm and the mesh-size of ~400 nm. Knowing the value of the relaxation parameter τ_{rep} given by the fit, we can estimate the filament length l_f from the two previous expressions in the different CP conditions and determine values of ~3–8 μm (see Table 1). Interestingly, these values are very close to the size of the actin cloud d_0, which we determine independently by the first measurable mechanical signature of the cloud.

Hence, the found values of the fit are directly consistent with the predictions of a decrease of filament length when CP concentration is increased (24). The model of entangled actin filaments can therefore explain both the approach and the relaxation phases.

Retraction phase

During the retraction phase, we observe two types of events:

1. Sticking events (see Fig. S2), where the force becomes abruptly negative until a threshold value is reached and then quickly relaxes; and
2. A continuous decrease of the force that becomes negative after an average retraction of 3.5 μm and returns to zero at large distances.

Although the sticking event can be explained by interaction between the probe bead and the actin, the second case can be modeled phenomenologically by assuming a partial closure of the actin network behind the bead, as sketched in Fig. 4 (*right part* of the *graph*). The details of the fit function are given in the Materials and Methods. Briefly, we assume a transition between the elastic force generated by the actin cloud between the two beads and an additional viscoelastic contribution that accounts for the partially closed actin cloud behind the bead during the resting phase.

Biological relevance of the actin cloud emanating from cortical actin

The actin cytoskeleton is involved in many cellular events spanning from setting cell shape to the regulation of gene expression. Further experiments hint for a possible direct mechanical transmission of forces from the outside toward the nucleus via the actin cytoskeleton. Because the actin cytoskeleton is already known to be important in the positioning of the nucleus and presents a force transmission role in cells, it can be speculated that such force transmission may directly or indirectly trigger changes in gene expression. The mechanical link from extracellular environment to the nucleus is established by actin bundles that connect integrins and proteins of the nuclear envelope (35). However, to explain the role of actin in organelle and nucleus positioning (14,15), more than just such actin bundles should be taken into account.

Our experiments highlight that an actin network emanating from the actin cortex can sustain forces in the range of 10 pN. A force of 10 pN is sufficient for dragging

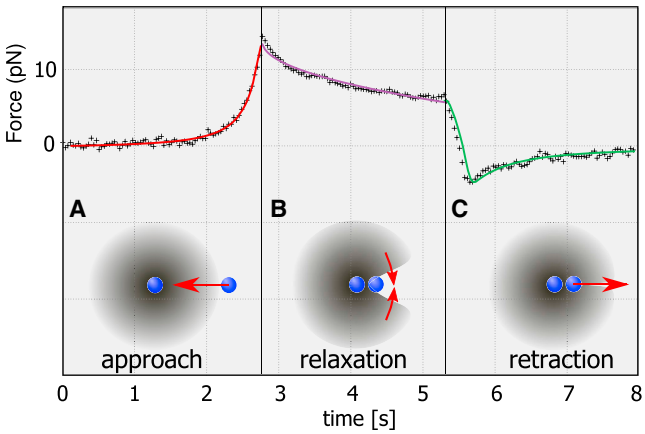


FIGURE 4 Model and example of a full fit for the measured force-evolution. (*A*) (*Red*) While approaching, the bead deforms the full actin cloud between the two beads leading to the measured forces that are fitted by the model of polymer elasticity including the discussed nonlinear Young's modulus. (*B*) (*Violet*) Subsequent viscoelastic relaxation of the network between the two beads, following the theory of polymer relaxation of sparse actin networks given in Eq. 9. To understand the negative forces in the retracting phase, we imply that the network behind the bead is starting to relax into the void created by the bead during the approach phase (*red arrows*). (*C*) (*Green*) This leads to an additional elastic constraint while the bead returns to the initial position, which explains the negative force during the return phase.

organelles inside cells. Moreover, the capacity of Arp2/3 branched networks to reorganize in parallel structure, as well as nucleators as formins (6), can allow a constantly polymerizing cortical network to push throughout the inside of a cell and exert sufficient forces to move organelles and chromosomes (17). Indeed, networks observed inside cells are generally anchored to the cortical actin network (14,36–38). Because we show that mechanical parameters of filaments far away from nucleation sites may sustain forces up to 15 pN, we anticipate that unbranched actin filaments connected to cortical actin may provide a mechanical scaffold for a general mechanism of positioning and long-range interplay between organelles in oocytes (39,40) or even in large-scale systems like *Drosophila* development (16). Recently, the role of an actin network with similar properties as the here-described actin cloud had been identified in large cells such as *Xenopus* oocytes, which directly shows the mechanical relevance of the actin cloud in intracellular organization (18).

CONCLUSION

The transition from a dense actin network, which is polymerized off an Arp2/3 complex-activated surface to the bulk medium, is not abrupt. We identify and characterize a large transition zone, the actin cloud. These actin clouds are very soft compared to the dense actin network that is formed at the location of the Arp2/3 complex activation. Our in vitro experiments show that this actin cloud also gives a mechanical support with a far-reaching mechanical effect that scales inversely to the distance, a property that can be explained by polymer theory. The predicted viscoelastic properties and extracted material properties are in good agreement with our measurements. The actin cloud cannot be ignored in the context of cellular events such as nucleus positioning and oocyte maturation that have been shown to happen on force scales of several pN (18). Moreover, we enlighten a general mechanical feature of sparse actin networks that can serve as a useful mechanism to displace and organize the different cellular compartments.

SUPPORTING MATERIAL

Seven figures and one movie are available at http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(14)00724-3.

The authors thank Klaus Kroy, Claus Heussinger, and Hervé Isambert for helpful discussions.

K.C. was supported by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. M.B. and J.L. were supported by the Axa Research Fund. This work was also funded by the Fédération dynamique des systèmes complexes of the University Paris 6 and supported by French Agence Nationale de la Recherche (ANR) grants No. ANR-11-JSV5-0002, No. ANR-09-BLAN-0283, and No. ANR-12BSV5001401, and Fondation pour la Recherche Medicale grant No. DEQ20120323737.

REFERENCES

1. Fletcher, D. A., and R. D. Mullins. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 463:485–492.
2. Lecuit, T., P.-F. Lenne, and E. Munro. 2011. Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:157–184.
3. Betz, T., D. Koch, …, J. A. Käs. 2011. Growth cones as soft and weak force generators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108:13420–13425.
4. Salbreux, G., G. Charras, and E. Paluch. 2012. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends Cell Biol.* 22:536–545.
5. Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, …, C. Sykes. 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature*. 417:308–311.
6. Reymann, A.-C., J.-L. Martiel, …, M. Théry. 2010. Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat. Mater.* 9:827–832.
7. Pontani, L.-L., J. van der Gucht, …, C. Sykes. 2009. Reconstitution of an actin cortex inside a liposome. *Biophys. J.* 96:192–198.
8. Carvalho, K., J. Lemière, …, C. Sykes. 2013. Actin polymerization or myosin contraction: two ways to build up cortical tension for symmetry breaking. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 368:20130005.
9. Strehle, D., J. Schnauss, …, B. Gentry. 2011. Transiently crosslinked F-actin bundles. *Eur. Biophys. J.* 40:93–101.
10. Thoresen, T., M. Lenz, and M. L. Gardel. 2013. Thick filament length and isoform composition determine self-organized contractile units in actomyosin bundles. *Biophys. J.* 104:655–665.
11. Kawska, A., K. Carvalho, …, C. Sykes. 2012. How actin network dynamics control the onset of actin-based motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109:14440–14445.
12. Morone, N., T. Fujiwara, …, A. Kusumi. 2006. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J. Cell Biol.* 174:851–862.
13. Clark, A. G., K. Dierkes, and E. K. Paluch. 2013. Monitoring actin cortex thickness in live cells. *Biophys. J.* 105:570–580.

14. Iwabuchi, K., R. Minamino, and S. Takagi. 2010. Actin reorganization underlies phototropin-dependent positioning of nuclei in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Physiol.* 152:1309–1319.
15. Stürmer, K., O. Baumann, and B. Walz. 1995. Actin-dependent light-induced translocation of mitochondria and ER cisternae in the photoreceptor cells of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Cell Sci.* 108:2273–2283.
16. Huelsmann, S., J. Ylänne, and N. H. Brown. 2013. Filopodia-like actin cables position nuclei in association with perinuclear actin in *Drosophila* nurse cells. *Dev. Cell.* 26:604–615.
17. Kumaran, R. I., R. Thakar, and D. L. Spector. 2008. Chromatin dynamics and gene positioning. *Cell.* 132:929–934.
18. Feric, M., and C. P. Brangwynne. 2013. A nuclear F-actin scaffold stabilizes ribonucleoprotein droplets against gravity in large cells. *Nat. Cell Biol.* 15:1253–1259.
19. Smith, B. A., S. B. Padrick, …, J. Gelles. 2013. Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation. *eLife.* 2:e01008.
20. Charras, G. T., C.-K. Hu, …, T. J. Mitchison. 2006. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J. Cell Biol.* 175:477–490.
21. Mori, M., K. Somogyi, …, P. Lénárt. 2014. An Arp2/3 nucleated f-actin shell fragments nuclear membranes at nuclear envelope breakdown in starfish oocytes. *Curr. Biol.* 24:1421–1428.
22. Paluch, E., J. van der Gucht, and C. Sykes. 2006. Cracking up: symmetry breaking in cellular systems. *J. Cell Biol.* 175:687–692.
23. Gittes, F., and C. F. Schmidt. 1998. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Opt. Lett.* 23:7–9.
24. Achard, V., J.-L. Martiel, …, R. Boujemaa-Paterski. 2010. A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* 20:423–428.
25. Sykes, C., and J. Plastino. 2010. Cell biology: actin filaments up against a wall. *Nature.* 464:365–366.
26. Lemire, J., K. Guevorkian, …, T. Betz. 2013. α-hemolysin membrane pore density measured on liposomes. *Soft Matter.* 9:3181–3187.
27. Gardel, M. L., M. T. Valentine, …, D. A. Weitz. 2003. Microrheology of entangled F-actin solutions. *Phys. Rev. Lett.* 91:158302.
28. Marcy, Y., J. Prost, …, C. Sykes. 2004. Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:5992–5997.
29. Isambert, H., and A. C. Maggs. 1996. Dynamics and rheology of actin solutions. *Macromolecules.* 29:10361040.
30. MacKintosh, F. C., J. Käs, and P. A. Janmey. 1995. Elasticity of semiflexible biopolymer networks. *Phys. Rev. Lett.* 75:4425–4428.
31. Morse, D. C. 1998. Viscoelasticity of concentrated isotropic solutions of semiflexible polymers. 2. Linear response. *Macromolecules.* 31:7044–7067.
32. Semmrich, C., R. J. Larsen, and A. R. Bausch. 2008. Nonlinear mechanics of entangled F-actin solutions. *Soft Matter.* 4:1675–1680.
33. Pujol, T., O. du Roure, …, J. Heuvingh. 2012. Impact of branching on the elasticity of actin networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:10364–10369.
34. Fabry, B., G. N. Maksym, …, J. J. Fredberg. 2001. Scaling the microrheology of living cells. *Phys. Rev. Lett.* 87:148102.
35. Jaalouk, D. E., and J. Lammerding. 2009. Mechanotransduction gone awry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:63–73.
36. Schuh, M., and J. Ellenberg. 2008. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Curr. Biol.* 18:1986–1992.
37. Chaigne, A., C. Campillo, …, M.-E. Terret. 2013. A soft cortex is essential for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Nat. Cell Biol.* 15:958–966.
38. Lénárt, P., C. P. Bacher, …, J. Ellenberg. 2005. A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature.* 436:812–818.
39. Li, H., F. Guo, …, R. Li. 2008. Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. *Nat. Cell Biol.* 10:1301–1308.
40. Azoury, J., K. W. Lee, …, M.-H. Verlhac. 2011. Symmetry breaking in mouse oocytes requires transient F-actin meshwork destabilization. *Development.* 138:2903–2908.

Annexe B

Les tampons

B.1 Tampon G

L'actine AKL99 est achetée à l'état lyophilisé chez Cytoskeleton. Elle est purifiée à 99% à partir de muscles de lapin et reconstituée au sein de notre laboratoire. Afin de la rendre monomérique elle est diluée dans le tampon G et laissée sur glace à $4°C$ durant une nuit avant toute polymérisation.
Composition du tampon G :

- TRIS à 2 mM
- $CaCl_2$ à 0,2 mM
- ATP à 0,2 mM
- DTT à 0,2 mM

Le pH est ajusté entre 7 et 8,5.

B.2 Les Tampons liés à la polymérisation de l'actine

B.2.1 Polymérisation sur un liposome

Ce tampon est utilisé lorsque l'on souhaite polymériser de l'actine directement à la surface d'un liposome.
Composition du tampon :

- HEPES à 10 mM
- DTT à 1 mM
- DABCO à 0,5 mM
- $MgCl_2$ à 4 mM
- KCl à 100 mM
- ATP à 10 mM
- glucose 280 mM
- caséine à 0,05 mg/mL

Le pH est ajusté à 7,4.

B.2.2 Polymérisation sur un tube de membrane

B.2.2.1 TPE

C'est le tampon servant à remplir la chambre d'observation près incubée à la caséine.

- HEPES à 10 mM
- $CaCl_2$ à 0,05 mM
- DTT à 1 mM
- DABCO à 0,5 mM
- $MgCl_2$ à 2 mM
- KCl à 50 mM
- ATP à 5 mM
- glucose 70 mM

Le pH est ajusté à 7,4.

B.2.2.2 $\mathbf{TPE}_{inj}$

Il s'agit du tampon d'injection présent dans la micropipette. Il est très proche du TPE mais ne permet pas à l'actine de polymériser afin d'éviter de boucher la micropipette.

- HEPES à 10 mM
- DTT à 1 mM
- DABCO à 0,5 mM
- $MgCl_2$ à 1 mM
- glucose 140 mM

Le pH est ajusté à 7,4.

B.2.3 Polymérisation en masse, TPM

Ce tampon est utilisé pour former des filaments d'actine que l'on peut ensuite lier à une membrane de liposome en utilisant de la streptavidine.
Composition du tampon :

- TRIS à 1 mM
- KCl à 50 mM
- $MgCl_2$ à 2 mM
- DTT à 0,1 mM
- Imidazole à 25 mM
- ATP à 1 mM
- caséine à 0,02 mg/mL

– sucrose 70 mM

Le pH est ajusté à 7,4.

B.3 Tampon de l'α-hémolysine

L'α-hémolysine est achetée chez Sigma Aldrich est dissoute à une concentration de 1mg.mL^{-1} dans le tampon suivant :

– KCl à 150 mM
– HEPES à 10 mM

B.4 Tampon de dialyse des myosines II, l'AB300

La myosine II est purifiée à partir de muscles de lapin et conservée dans du glycérol à -20°C. Avant toute utilisation expérimentale on supprime le glycérol en dyalisant ce mélange contre l'AB300 durant une nuit à 4°C

Composition du tampon AB300 :

– KCl à 300 mM
– $MgCl_2$ à 4 mM
– Imidazole à 25 mM
– DTT à 1 mM

Le pH est ajusté à 7,4.

B.5 Tampon Shiga Toxine

Lorsque la toxine est utilisée à l'extérieur d'un liposome le tampon a la composition suivante :

– NaCl à 100 mM
– HEPES à 25 mM
– EGTA à 0,5 mM
– caséine à 0,05 mg/mL
– glucose à 75 mM

Le pH est ajusté à 7,4.

Cependant pour les expériences dans lesquelles la toxine est encapsulée à l'intérieur d'un liposome la caséine est supprimée et le glucose est remplacé par du sucrose à la même concentration.

B.6 Tampon Endophiline A2

Il s'agit du tampon dans lequel se trouve l'endophiline-A2 en fin de purification auquel est ajouté de la caséine et du glucose pour les expériences menées sur liposomes. Composition du tampon :

- NaCl à 100 mM
- HEPES à 25 mM
- EGTA à 0,5 mM
- caséine à 0,05 mg/mL
- glucose à 75 mM

Le pH est ajusté à 7,4.

Annexe C

Test de motilité des myosines

- Préparer de l'actine-G à 4 µM composée à 20% d'actine A-488.
- Nettoyer à l'acétone une lamelle et la recouvrir d'un solution de nitrocellulose (nitrocellulose dans de l'amylacetate à 0,1% massique/volume) et laisser sécher durant 1 h30.
- Construire la chambre : on utilise deux lamelles recouvertes de nitrocellulose (qui se font face) que l'on sépare par un film de parafilm dans lequel on à préalablement découper un canal qui traverse la chambre de part en part. On chauffe légèrement le système pour que le parafilm fonde et soude les deux lamelles ensemble.
- Polymériser l'actine durant 1 h dans le tampon de polymérisation, puis ajouter 5 µM de phalloïdine pour stabiliser l'actine-F.
- Faire passer dans la chambre une solution de myosine (dans le tampon AB300). On laisse reposer 5 min. Puis on rince la chambre en injectant la solution de TPE.
- Préparer une solution d'actine-F à 20 nM.
- Injecter cette solution d'actine-F dans la chambre.
- Observer le fond de la chambre au microscope : les filaments d'actine sont mis en mouvement par le tapis de myosines.

Annexe D

Polymérisation d'actine

L'actine-G est préparée à 30 µM et contient 20% molaire d'actine fluorescente. Pour les trois premiers protocoles la solution utilisée est la même, il s'agit du tampon de polymérisation sur liposome donné en Annexe B.

D.1 Polymérisation en solution

Dans la solution de polymérisation (en général 30 µL) on ajoute :

- 3 µM d'actine-G
- 9 µM de profiline
- 120 nM de complexe Arp2/3
- 0,64 µM d'activateur

Le mélange est préparé sur glace et mis à température ambiante lorsque l'on veut initier la polymérisation.

D.2 Polymérisation sur liposomes

Les concentrations en protéines sont exactement les mêmes que pour la polymérisation en solution, seul l'ordre d'incorporation des protéines devient important. Dan la solution de polymérisation on ajoute l'activateur, une fois homogénéisé on injecte les liposomes. On laisse incuber durant un minium de 15 min (pour que l'activateur se lie à la surface des liposomes). On injecte ensuite (dans l'ordre) le complexe Arp2/3, la profiline, la CP et l'actine-G.

D.3 Polymérisation sur billes

Les billes en polystyrène sont diluées par 200 (par rapport à la solution commerciale) dans de l'eau. On re-dilue la solution de billes par deux dans la solution de polymérisation pour former 20 µL de solution contenant 2 µM d'activateur. Cette préparation est laissée sous agitation, durant 20 min et à température ambiante. Les billes se recouvrent

alors de l'activateur. Cette préparation peut se garder un jour sur glace. On place ensuite 1 µL de la préparation de billes dans 19 µL de solution de polymérisation contenant 4 µM d'actine-G, 12 µM de profiline, 25 nM de complexe Arp2/3 et de la CP (entre 0 et 50 nM pour les expériences menées).

D.4 Polymérisation d'actine biotinylée

Ce protocole est utilisé pour former des filaments d'actine contenant de la biotine qui sont ensuite collés sur la membrane des liposomes. Il nécessite 3 mix à préparer à l'avance. On utilise de tampon de polymérisation en masse (TPM) pour former les différentes solutions :

1. Mix1 :
   - 3 µL d'actine-G à 30 µM
   - 13,5 µL de TPM

   On laise se mix à température ambiante durant 1 h pour laisser le temps à l'actine de polymériser.
2. Mix2 :
   - 10 µL de solution de liposomes
   - 15 µL de TPM
   - 0,5 µg/mL de streptavidine

   On laisse incuber les liposome avec la streptavidine à température ambiante, environ 15 min ou 30 min si l'on veut former des doublets de liposomes.
3. Mix3 :
   - 10 µL de phalloïdine à 100 µM
   - 9 µL de TPM

   Ce mix est laissé sur glace.

Dans un Eppendorf on mélange ensuite, en respectant l'ordre :

- 10 µL de mix 1
- 1 µL de mix 3, pour stabiliser les filaments d'actine.
- 29 µL de TPM
- 10 µL de mix 2, contenant les liposomes qui vont se recouvrir des filaments d'actine.

Annexe E

Formation des liposomes

E.1 Electroformation

A l'aide d'une seringue Hamilton on dépose 10 µL de lipides en solution sur deux plaques de verre recouvertes d'une couche mince d'ITO (Indium Tin Oxyde). La surface du verre ainsi recouverte devient conductrice tout en restant transparente, permettant ainsi l'observation au microscope de la formation des liposomes. Le tout est ensuite placé dans une chambre à vide durant 1 h afin d'évaporer le solvant à base de chloroforme et/ou de méthanol. On obtient alors un film sec de lipides sur les plaques ITO. Si des molécules fluorescentes sont ajoutées au mélange lipidique on prendra soin de recouvrir les plaques de papier d'aluminium afin de protéger les fluorophores de la lumière.

Les deux lames ITO sont ensuite assemblées pour former la cellule d'électroformation en plaçant les faces conductrices en face l'une de l'autre. Deux cales d'espacement en Teflon permettent de maintenir une hauteur de séparation entre les deux lames ITO de quelques millimètres. De la pâte Vitrex est utilisée tout autour du dépôt de lipides pour fermer hermétiquement la chambre. Deux pinces sont ajoutées pour maintenir une pression sur la chambre durant toute la suite des opérations. On prendra soin de garder deux petites ouvertures à travers la pâte Vitrex : une pour faire appel d'air et l'autre pour la remplir, avant de la sceller.

La chambre est alors remplie de la solution de gonflement puis reliée à un générateur basse fréquence délivrant une tension de 1 V_{pp} à une fréquence de 10 Hz durant un minimum d'une heure. La taille des liposomes augmente avec la durée d'application du champ électrique. Cette étape est effectuée à température ambiante. La solution de gonflement sera donc à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes.

La solution contenant les liposomes est délicatement aspirée à l'aide d'une micropipette de 1 mL. On aura préalablement formé un trou dans la pâte Vitrex, à l'opposé de la zone de prélèvement, afin de faire un appel d'air. La solution peut généralement être conservée dans un tube Eppendorf à 4°C durant quelques jours.

E.2 Emulsion inverse

Tout d'abord il faut dissoudre dans une solution de chloroforme/méthanol les lipides puis sécher sous un flux d'azote la solution afin d'éliminer toute trace de solvant. Le film de lipides est ensuite re-suspendu dans une huile minérale (Sigma-Aldrich M5904, Mineral oil) de manière à avoir une concentration de 0,5mg.mL^{-1}. Pour dissoudre les lipides la solution est passée 30 minutes au bain-marie sonicateur à 30°C avec une puissance de 30W. On laisse ensuite le mélange refroidir 1h sur la paillasse.

L'étape suivante consiste à former une émulsion inverse, c'est-à-dire que l'on introduit 1,25 µL de solution aqueuse dans 25 µL d'huile contenant les lipides. Une seringue hamiltone est utilisée pour aspirer et éjecter rapidement ce mélange jusqu'à ce qu'il prenne une couleur laiteuse, signe de la présence de l'émulsion par diffusion de la lumière visible au travers. Le rapport eau/huile est choisi de manière à obtenir une émulsion suffisamment stable qui ne démixe pas avant plusieurs heures. Les gouttes d'émulsion obtenues renferment le futur milieu interne des liposomes et sont stabilisées à leur surface grâce aux lipides présents dans l'huile qui forment le futur feuillet interne de la bicouche lipidique (FIG :E.1,A). En parallèle, dans un Eppendorf, on dépose 30 µL de la même solution d'huile contenant les lipides au-dessus de 30 µL d'une phase aqueuse correspondant à la future solution externe. La phase huile étant moins dense, elle reste au dessus de la phase aqueuse et les lipides sont alors libres de diffuser à l'interface formant ainsi le futur feuillet externe des liposomes (FIG :E.1,B).

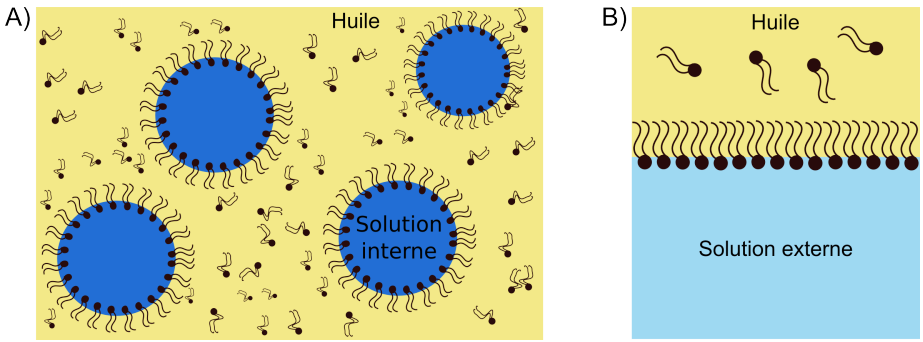


FIGURE E.1 – Représentation schématique de la technique d'émulsion inverse. A) Étape de formation de l'émulsion d'eau dans l'huile, l'arrangement spontané des lipides stabilise les gouttes d'eau. B) Arrangement spontané des lipides à l'interface plane huile/eau qui formeront le futur feuillet externe des liposomes.

Il faut alors rassembler les deux monocouches de lipides. Pour cela on dépose délicatement 50 µL de l'émulsion dans la phase supérieure de l'Eppendorf utilisée pour former une interface plane (FIG :E.1,B). Le tout est centrifugé durant 5 minutes à

300 g. Cette étape force la sédimentation des gouttes et les oblige à passer au travers de l'interface huile/solution extérieure où la deuxième couche de lipides peut s'assembler (FIG :E.2,A). Une fois l'interface traversée on obtient des liposomes (FIG :E.2,B).

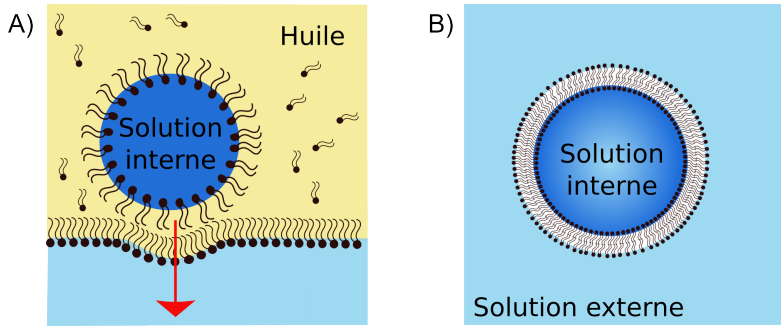


FIGURE E.2 – Dernières étapes de l'émulsion inverse. A) Par centrifugation, représentée à l'aide de la flêche rouge, on force le passage de gouttes au travers d'une seconde couches de lipides disposée à l'interface entre la solution extérieure et le mélange huile/lipides. B) Une fois que la goutte est entièrement passée dans la solution extérieure elle possède deux couches lipidiques : il s'agit alors d'un liposome.

E.3 Liposome à membrane asymétrique

On donne ici le protocole de formation des liposomes à membrane asymétrique avec les tampons et les compositions membranaires utilisées dans l'article en préparation (chapitre 4, section 4.5).

Lipides et produits chimiques

Egg phosphatidylcholine (EPC), cholestérol (Chol), L-α-phosphati-dylinositol-4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2) et le brain total lipid extract (BE) sont achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Ceramide trihexosides (Gb3) vient de chez Matreya LLC (Pleasant Gap, PA, USA). Tous les produits chimiques, y compris l'huile minérale proviennent de chez Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

Les solutions

Composition des solutions maintenues à pH=7,4 :

- interne : 5 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,5 mM EGTA et 75 mM de sucrose
- externe : 25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0,5 mM EGTA, 0,05 mg.ml^{-1} β-casein et 75 mM glucose.

Préparation des liposomes

Ils sont obtenus en utilisant la technique de l'émulsion inverse. On prépare deux solutions d'huile/lipides, à une concentration de 0,5 mg.ml^{-1}, contenant soit le mélange EPC/Chol/Gb3 (65 :30 :5 en % molaire) pour le feuillet interne soit le mélange BE/PI(4,5)P2 (95 :5 en % molaire) pour le feuillet externe.

Un volume de 2,5 ml de chaque solution huile/lipide est passée 30 minutes au bain-marie sonicateur à 35°C avec une puissance de 30W.

Un volume de 30 µL de la solution huile/lipide-extérieur est placée au fond d'un tube Eppendorf au-dessus du même volume de solution extérieure. Le tube est laissé 2 h à température ambiante.

En parallèle, on forme une émulsion en mélangeant 250 µL de solution d'huile/lipide-intérieur avec 1,25 µL de solution interne (avec ou sans protéines), à l'aide d'une seringue hamiltone. 50 µL de cette émulsion est pipettée et déposée délicatement sur la phase supérieure du tube Eppendorf. On passe, immédiatement après, le tube à la centrifugeuse à 250 g pendant 5 min.

On aspire la partie supérieure contenant l'huile (∼80 µL) et l'on récupère délicatement 20 µL au fond du tube Eppendorf, où les liposomes ont sédimenté.

Bibliographie

[Abkarian *et al.* 2011] Manouk Abkarian, Etienne Loiseau et Gladys Massiera. *Continuous droplet interface crossing encapsulation (cDICE) for high throughput monodisperse vesicle design*, 2011. (Cité en page 45.)

[Achard *et al.* 2010] Vérane Achard, Jean-Louis Martiel, Alphée Michelot, Christophe Guérin, Anne-Cécile Reymann, Laurent Blanchoin et Rajaa Boujemaa-Paterski. *A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility.* Current biology : CB, vol. 20, pages 423–428, 2010. (Cité en page 36.)

[Alberts *et al.* 2002] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts et Peter Walter. Molecular Biology of the Cell. 4 édition, 2002. (Cité en pages 4, 5, 9, 14, 23, 25, 26 et 27.)

[Angelova & Dimitrov 1986] Miglena I. Angelova et Dimiter S. Dimitrov. *Liposome electroformation*, 1986. (Cité en page 42.)

[Betz *et al.* 2009] Timo Betz, Martin Lenz, Jean-François Joanny et Cécile Sykes. *ATP-dependent mechanics of red blood cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 106, no. 36, pages 15320–5, Septembre 2009. (Cité en pages 50 et 58.)

[Blanchoin *et al.* 2014] Laurent Blanchoin, Rajaa Boujemaa-paterski, Cécile Sykes et Julie Plastino. *Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility.* pages 235–263, 2014. (Cité en page 5.)

[Bornschlögl 2013] Thomas Bornschlögl. *How filopodia pull : What we know about the mechanics and dynamics of filopodia.* Cytoskeleton (Hoboken, N.J.), vol. 70, pages 590–603, 2013. (Cité en page 8.)

[Boucrot *et al.* 2012] Emmanuel Boucrot, Adi Pick, Gamze Çamdere, Nicole Liska, Emma Evergren, Harvey T McMahon et Michael M Kozlov. *Membrane fission is promoted by insertion of amphipathic helices and is restricted by crescent BAR domains.* Cell, vol. 149, no. 1, pages 124–36, Mars 2012. (Cité en page 86.)

[Boukellal *et al.* 2004] Hakim Boukellal, Otger Campás, Jean-François Joanny, Jacques Prost et Cécile Sykes. *Soft Listeria : actin-based propulsion of liquid drops.* Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics, vol. 69, page 061906, 2004. (Cité en page 36.)

[Cameron *et al.* 1999] L A Cameron, M J Footer, A van Oudenaarden et J A Theriot. *Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, pages 4908–4913, 1999. (Cité en page 33.)

[Cameron *et al.* 2001] L A Cameron, T M Svitkina, D Vignjevic, J A Theriot et G G Borisy. *Dendritic organization of actin comet tails.* Current biology : CB, vol. 11, pages 130–135, 2001. (Cité en page 34.)

[Campillo *et al.* 2013] Clément Campillo, Pierre Sens, Darius Köster, Léa Laetitia Pontani, Daniel Lévy, Patricia Bassereau, Pierre Nassoy et Cécile Sykes. *Unexpected membrane dynamics unveiled by membrane nanotube extrusion.* Biophysical Journal, vol. 104, pages 1248–1256, 2013. (Cité en page 159.)

[Carlier *et al.* 1993] M F Carlier, C Jean, K J Rieger, M Lenfant et D Pantaloni. *Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio : possible implication in the regulation of actin dynamics.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 90, pages 5034–5038, 1993. (Cité en page 18.)

[Carlier *et al.* 2003] Marie-france Carlier, Christophe Le Clainche, Sebastian Wiesner et Dominique Pantaloni. *Actin-based motility : from molecules to movement.* BioEssays, vol. 25, no. 4, pages 336–345, 2003. (Cité en pages 33 et 36.)

[Carvalho *et al.* 2013] Kevin Carvalho, Feng-Ching Tsai, Edouard Lees, Raphaël Voituriez, Gijsje H Koenderink et Cecile Sykes. *Cell-sized liposomes reveal how actomyosin cortical tension drives shape change.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 110, no. 41, pages 16456–16461, Octobre 2013. (Cité en pages 48 et 49.)

[Chaigne *et al.* 2013] Agathe Chaigne, Clément Campillo, Nir S Gov, Raphaël Voituriez, Jessica Azoury, Claudia Umaña Diaz, Maria Almonacid, Isabelle Queguiner, Pierre Nassoy, Cécile Sykes, Marie-Hélène Verlhac et Marie-Emilie Terret. *A soft cortex is essential for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes.* Nature cell biology, vol. 15, no. 8, pages 958–66, Août 2013. (Cité en page 51.)

[Dabiri *et al.* 1990] G A Dabiri, J M Sanger, D A Portnoy et F S Southwick. *Listeria monocytogenes moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 87, pages 6068–6072, 1990. (Cité en page 31.)

[Derényi *et al.* 2002] Imre Derényi, Frank Jülicher et Jacques Prost. *Formation and interaction of membrane tubes.* Physical review letters, vol. 88, page 238101, 2002. (Cité en page 52.)

[Devaux & Morris 2004] Philippe F Devaux et Roger Morris. *Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes.* Traffic (Copenhagen, Denmark), vol. 5, pages 241–246, 2004. (Cité en page 37.)

[Engelhardt & Ljubimowa 1939] W. A. Engelhardt et M. N. Ljubimowa. *1939 Nature Publishing Group.* Nature, vol. 144, pages 668–669, 1939. (Cité en page 23.)

[Erba *et al.* 1986] H P Erba, P Gunning et L Kedes. *Nucleotide sequence of the human gamma cytoskeletal actin mRNA : anomalous evolution of vertebrate non-muscle*

actin genes. Nucleic acids research, vol. 14, pages 5275–5294, 1986. (Cité en page 12.)

[ESFA 2009] ESFA. *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007.* European Food Safety Authority, vol. 223, page 312, 2009. (Cité en page 31.)

[Evans & Rawicz 1990] E. Evans et W. Rawicz. *Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes*, 1990. (Cité en page 50.)

[Evans *et al.* 1996] E Evans, H Bowman, A Leung, D Needham et D Tirrell. *Biomembrane templates for nanoscale conduits and networks.* Science (New York, N.Y.), vol. 273, pages 933–935, 1996. (Cité en page 51.)

[Fahy *et al.* 2011] Eoin Fahy, Dawn Cotter, Manish Sud et Shankar Subramaniam. *Lipid classification, structures and tools.* Biochimica et biophysica acta, vol. 1811, no. 11, pages 637–47, Novembre 2011. (Cité en page 10.)

[Fraser *et al.* 1994] Marie E. Fraser, Maia M. Chernaia, Yuri V. Kozlov et Michael N.G. James. *Crystal structure of the holotoxino from Shigella dysenteriae at 2.5 Åresolution*, 1994. (Cité en page 79.)

[Fuchs *et al.* 1986] G Fuchs, M Mobassaleh, A Donohue-Rolfe, R K Montgomery, R J Grand et G T Keusch. *Pathogenesis of Shigella diarrhea : rabbit intestinal cell microvillus membrane binding site for Shigella toxin.* Infection and immunity, vol. 53, pages 372–377, 1986. (Cité en page 80.)

[Fujiwara *et al.* 2002] Ikuko Fujiwara, Shin Takahashi, Hisashi Tadakuma, Takashi Funatsu et Shin'ichi Ishiwata. *Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments.* Nature cell biology, vol. 4, pages 666–673, 2002. (Cité en page 15.)

[Gallop *et al.* 2006] Jennifer L Gallop, Christine C Jao, Helen M Kent, P Jonathan G Butler, Philip R Evans, Ralf Langen et Harvey T McMahon. *Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature.* The EMBO journal, vol. 25, pages 2898–2910, 2006. (Cité en pages 83 et 85.)

[Gögler *et al.* 2007] Michael Gögler, Timo Betz et Josef Alfons Käs. *Simultaneous manipulation and detection of living cell membrane dynamics.* Optics letters, vol. 32, pages 1893–1895, 2007. (Cité en page 58.)

[Goley & Welch 2006] ED Goley et MD Welch. *The ARP2/3 complex : an actin nucleator comes of age.* Nature reviews Molecular cell biology, vol. 7, pages 713–726, 2006. (Cité en pages 17, 19, 20 et 21.)

[Gortat *et al.* 2012] Anna Gortat, Mabel Jouve San-Roman, Christian Vannier et Anne a Schmidt. *Single point mutation in Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) sequence of endophilin impairs dimerization, membrane shaping, and Src homology 3 domain-mediated partnership.* The Journal of biological chemistry, vol. 287, no. 6, pages 4232–47, Février 2012. (Cité en page 86.)

[Guevorkian *et al.* 2011] Karine Guevorkian, David Gonzalez-Rodriguez, Camille Carlier, Sylvie Dufour et Françoise Brochard-Wyart. *Mechanosensitive shivering of model tissues under controlled aspiration.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 108, pages 13387–13392, 2011. (Cité en page 51.)

[Helfrich 1973] W Helfrich. *Elastic properties of lipid bilayers : theory and possible experiments.* Zeitschrift für Naturforschung. Teil C : Biochemie, ..., vol. 28, pages 693–703, 1973. (Cité en page 49.)

[Horger *et al.* 2009] Kim S Horger, Daniel J Estes, Ricardo Capone et Michael Mayer. *Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength.* Journal of the American Chemical Society, vol. 131, pages 1810–1819, 2009. (Cité en pages 40 et 41.)

[Israelachvili 1992] J N Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*, 1992. (Cité en page 38.)

[Janmey *et al.* 1985] P A Janmey, C Chaponnier, S E Lind, K S Zaner, T P Stossel et H L Yin. *Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking.* Biochemistry, vol. 24, pages 3714–3723, 1985. (Cité en page 21.)

[Jao *et al.* 2010] Christine C Jao, Balachandra G Hegde, Jennifer L Gallop, Prabhavati B Hegde, Harvey T McMahon, Ian S Haworth et Ralf Langen. *Roles of amphipathic helices and the bin/amphiphysin/rvs (BAR) domain of endophilin in membrane curvature generation.* The Journal of biological chemistry, vol. 285, pages 20164–20170, 2010. (Cité en page 85.)

[Jewett & Forster 2010] Michael C Jewett et Anthony C Forster. *Update on designing and building minimal cells.* Current opinion in biotechnology, vol. 21, pages 697–703, 2010. (Cité en page 55.)

[Johannes & Mayor 2010] Ludger Johannes et Satyajit Mayor. *Induced domain formation in endocytic invagination, lipid sorting, and scission.* Cell, vol. 142, pages 507–510, 2010. (Cité en page 78.)

[Johannes & Popoff 2008] Ludger Johannes et Vincent Popoff. *Tracing the Retrograde Route in Protein Trafficking*, 2008. (Cité en page 81.)

[Johannes & Römer 2010] Ludger Johannes et Winfried Römer. *Shiga toxins–from cell biology to biomedical applications.* Nature reviews. Microbiology, vol. 8, no. 2, pages 105–16, Février 2010. (Cité en page 78.)

[Kabsch *et al.* 1990] W Kabsch, H G Mannherz, D Suck, E F Pai et K C Holmes. *Atomic structure of the actin :DNase I complex.* Nature, vol. 347, pages 37–44, 1990. (Cité en page 13.)

[Kawska *et al.* 2012] A. Kawska, K. Carvalho, J. Manzi, R. Boujemaa-Paterski, L. Blanchoin, J.-L. Martiel et C. Sykes. *How actin network dynamics control the onset of actin-based motility*, 2012. (Cité en pages 21, 35, 107 et 112.)

[Kjaerulff *et al.* 2011] Ole Kjaerulff, Lennart Brodin et Anita Jung. *The structure and function of endophilin proteins.* Cell biochemistry and biophysics, vol. 60, pages 137–154, 2011. (Cité en page 83.)

[Koretz 1982] Jane F Koretz. *[6] Hybridization and reconstitution of thick-filament structure.* In Leon W Cunningham B T Methods in Enzymology Dixie W. Frederiksen, editeur, Structural and Contractile Proteins Part B : The Contractile Apparatus and the Cytoskeleton, volume Volume 85, pages 20–55. Academic Press, 1982. (Cité en page 26.)

[Kron & Spudich 1986] S J Kron et J A Spudich. *Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 83, pages 6272–6276, 1986. (Cité en page 26.)

[Lauvrak *et al.* 2004] Silje U Lauvrak, Maria L Torgersen et Kirsten Sandvig. *Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin.* Journal of cell science, vol. 117, pages 2321–2331, 2004. (Cité en page 81.)

[Le Goff *et al.* 2006] Catherine Le Goff, Véronique Laurent, Kristell Le Bon, Gaëlle Tanguy, Anne Couturier, Xavier Le Goff et René Le Guellec. *pEg6, a spire family member, is a maternal gene encoding a vegetally localized mRNA in Xenopus embryos.* Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization, vol. 98, no. 12, pages 697–708, Décembre 2006. (Cité en page 20.)

[Lee & Chen 1988] C Lee et L B Chen. *Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells.* Cell, vol. 54, pages 37–46, 1988. (Cité en page 51.)

[Lewis & Bridgman 1992] A K Lewis et P C Bridgman. *Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity.* The Journal of cell biology, vol. 119, pages 1219–1243, 1992. (Cité en page 8.)

[Lodish *et al.* 2012] Harvey F Lodish, Arnold Berk, Chris Kaiser, Monty Krieger, Anthony Brestscher, Hidde Ploegh, A. Amon, Matthew P. Scoot et Paul Matsudaira. Molecular Cell Biology. W. H.. Freeman and Company, N.Y., 7 édition, 2012. (Cité en page 12.)

[Loisel *et al.* 1999] T P Loisel, R Boujemaa, D Pantaloni et M F Carlier. *Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins.* Nature, vol. 401, pages 613–616, 1999. (Cité en page 33.)

[Ma & Cockroft 2010] Long Ma et Scott L Cockroft. *Biological nanopores for single-molecule biophysics.* Chembiochem : a European journal of chemical biology, vol. 11, no. 1, pages 25–34, Janvier 2010. (Cité en page 64.)

[Machesky *et al.* 1994] L M Machesky, S J Atkinson, C Ampe, J Vandekerckhove et T D Pollard. *Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose.* The Journal of cell biology, vol. 127, pages 107–115, 1994. (Cité en page 18.)

[Machesky *et al.* 1999] L M Machesky, R D Mullins, H N Higgs, D A Kaiser, L Blanchoin, R C May, M E Hall et T D Pollard. *Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 96, pages 3739–3744, 1999. (Cité en page 18.)

[Mahfoud *et al.* 2010] Radhia Mahfoud, Adam Manis, Beth Binnington, Cameron Ackerley et Clifford A Lingwood. *A major fraction of glycosphingolipids in model and cellular cholesterol-containing membranes is undetectable by their binding proteins.* The Journal of biological chemistry, vol. 285, pages 36049–36059, 2010. (Cité en page 80.)

[Manneville *et al.* 2001] J B Manneville, P Bassereau, S Ramaswamy et J Prost. *Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration.* Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics, vol. 64, page 021908, 2001. (Cité en page 51.)

[Marcy *et al.* 2004] Yann Marcy, Jacques Prost, Marie-France Carlier et Cécile Sykes. *Forces generated during actin-based propulsion : a direct measurement by micromanipulation.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, pages 5992–5997, 2004. (Cité en page 35.)

[Mathivet *et al.* 1996] L Mathivet, S Cribier et P F Devaux. *Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field.* Biophysical journal, vol. 70, no. 3, pages 1112–21, Mars 1996. (Cité en page 42.)

[Mccullough *et al.* 2011] Brannon R Mccullough, Elena E Grintsevich, Christine K Chen, Hyeran Kang, Alan L Hutchison, Arnon Henn, Wenxiang Cao, Cristian Suarez, Jean-louis Martiel, Laurent Blanchoin, Emil Reisler et Enrique M De La Cruz. *Cofilin-Linked Changes in Actin Filament Flexibility Promote Severing.* Biophysj, vol. 101, no. 1, pages 151–159, 2011. (Cité en page 22.)

[McGough *et al.* 1997] A McGough, B Pope, W Chiu et A Weeds. *Cofilin changes the twist of F-actin : implications for actin filament dynamics and cellular function.* The Journal of cell biology, vol. 138, pages 771–781, 1997. (Cité en page 22.)

[Meinecke *et al.* 2013] Michael Meinecke, Emmanuel Boucrot, Gamze Camdere, Wai-Ching Hon, Rohit Mittal et Harvey T McMahon. *Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission.* The Journal of biological chemistry, vol. 288, no. 9, pages 6651–61, Mars 2013. (Cité en page 85.)

[Mele *et al.* 2014] Caterina Mele, Giuseppe Remuzzi et Marina Noris. *Hemolytic uremic syndrome.* Seminars in immunopathology, Février 2014. (Cité en page 78.)

[Menestria 1986] Gianfranco Menestria. *Ionic Channels Formed by Staphylococcus aureus Alpha-Toxin : Voltage-Dependent Inhibition by Divalent and Trivalent Cation.* J. Membrane Biol., vol. 190, pages 177–190, 1986. (Cité en page 64.)

[Mim & Unger 2012] Carsten Mim et Vinzenz M. Unger. *Membrane curvature and its generation by BAR proteins.* Trends in Biochemical Sciences, vol. 37, pages 526–533, 2012. (Cité en page 83.)

[Mohandas & Evans 1994] N Mohandas et E Evans. *Mechanical properties of the red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects.* Annual review of biophysics and biomolecular structure, vol. 23, pages 787–818, 1994. (Cité en page 51.)

[Mollenhauer & Morré 1998] H H Mollenhauer et D J Morré. *The tubular network of the Golgi apparatus.* Histochemistry and cell biology, vol. 109, no. 5-6, pages 533–43, 1998. (Cité en page 51.)

[Montoya & Gouaux 2003] Michelle Montoya et Eric Gouaux. *Beta-barrel membrane protein folding and structure viewed through the lens of alpha-hemolysin.* Biochimica et biophysica acta, vol. 1609, pages 19–27, 2003. (Cité en page 46.)

[Morone *et al.* 2006] Nobuhiro Morone, Takahiro Fujiwara, Kotono Murase, Rinshi S Kasai, Hiroshi Ike, Shigeki Yuasa, Jiro Usukura et Akihiro Kusumi. *Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography.* The Journal of cell biology, vol. 174, pages 851–862, 2006. (Cité en page 6.)

[Noireaux & Libchaber 2004] Vincent Noireaux et Albert Libchaber. *A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, no. 51, pages 17669–74, Décembre 2004. (Cité en pages 45 et 56.)

[Noireaux *et al.* 2000] V Noireaux, R M Golsteyn, E Friederich, J Prost, C Antony, D Louvard et C Sykes. *Growing an actin gel on spherical surfaces.* Biophysical journal, vol. 78, pages 1643–1654, 2000. (Cité en pages 30 et 33.)

[Noireaux *et al.* 2011] Vincent Noireaux, Yusuke T Maeda et Albert Libchaber. *Development of an artificial cell, from self-organization to computation and self-reproduction.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 108, no. 9, pages 3473–3480, Mars 2011. (Cité en page 56.)

[O'Brien *et al.* 1984] A D O'Brien, J W Newland, S F Miller, R K Holmes, H W Smith et S B Formal. *Shiga-like toxin-converting phages from Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea.* Science (New York, N.Y.), vol. 226, pages 694–696, 1984. (Cité en page 78.)

[Pappenheimer *et al.* 1951] J.R. Pappenheimer, E.M. Renkin et L.M. Borrero. *Filtration, Diffsuion and Molecular Sieving Through Peripheral Capillary Membranes A contribution to the Pore Theory of Capillary Permeability.* vol. 167, 1951. (Cité en page 63.)

[Pautot *et al.* 2003a] Sophie Pautot, Barbara J Frisken et D a Weitz. *Engineering asymmetric vesicles.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, no. 19, pages 10718–21, Septembre 2003. (Cité en pages 43 et 88.)

[Pautot *et al.* 2003b] Sophie Pautot, Barbara J Frisken et D A Weitz. *Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion.* Langmuir, vol. 19, pages 2870–2879, 2003. (Cité en page 43.)

[Plastino & Sykes 2005] Julie Plastino et Cécile Sykes. *The actin slingshot.* Current opinion in cell biology, vol. 17, pages 62–66, 2005. (Cité en pages 34 et 112.)

[Plastino *et al.* 2004a] Julie Plastino, Ioannis Lelidis, Jacques Prost et Cécile Sykes. *The effect of diffusion, depolymerization and nucleation promoting factors on actin gel growth.* European biophysics journal : EBJ, vol. 33, pages 310–320, 2004. (Cité en page 30.)

[Plastino *et al.* 2004b] Julie Plastino, Stéphane Olivier et Cécile Sykes. *Actin filaments align into hollow comets for rapid VASP-mediated propulsion.* Current Biology, vol. 14, pages 1766–1771, 2004. (Cité en page 30.)

[Pollard & Borisy 2003] Thomas D Pollard et Gary G Borisy. *Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments.* vol. 112, pages 453–465, 2003. (Cité en pages 15 et 16.)

[Pollard & Weeds 1984] T. D. Pollard et A. G. Weeds. *The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin.* FEBS Letters, vol. 170, pages 94–98, 1984. (Cité en page 16.)

[Pollard 1986] T D Pollard. *Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments.* The Journal of cell biology, vol. 103, pages 2747–2754, 1986. (Cité en page 15.)

[Pontani *et al.* 2009] Léa-Laetitia Pontani, Jasper van der Gucht, Guillaume Salbreux, Julien Heuvingh, Jean-François Joanny et Cécile Sykes. *Reconstitution of an actin cortex inside a liposome.* Biophysical journal, vol. 96, no. 1, pages 192–8, Janvier 2009. (Cité en pages 36, 43, 47, 56 et 57.)

[Portnoy *et al.* 2002] Daniel A Portnoy, Victoria Auerbuch et Ian J Glomski. *The cell biology of Listeria monocytogenes infection : the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity.* The Journal of cell biology, vol. 158, pages 409–414, 2002. (Cité en page 32.)

[Pring *et al.* 2003] Martin Pring, Marie Evangelista, Charles Boone, Changsong Yang et Sally H Zigmond. *Mechanism of Formin-Induced Nucleation of Actin Filaments.* Biochemistry, vol. 42, no. 2, pages 486–496, Décembre 2003. (Cité en page 20.)

[Proulx *et al.* 2001] F Proulx, E G Seidman et D Karpman. *Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome.* Pediatric research, vol. 50, pages 163–171, 2001. (Cité en page 78.)

[Pruyne *et al.* 2002] David Pruyne, Marie Evangelista, Changsong Yang, Erfei Bi, Sally Zigmond, Anthony Bretscher et Charles Boone. *Role of formins in actin assembly : nucleation and barbed-end association.* Science (New York, N.Y.), vol. 297, pages 612–615, 2002. (Cité en page 20.)

[Purcell 1977] E. M. Purcell. *Life at low Reynolds number.* American Journal of Physics, vol. 45, page 3, 1977. (Cité en page 33.)

[Quinlan *et al.* 2005] Margot E Quinlan, John E Heuser, Eugen Kerkhoff et R Dyche Mullins. *Drosophila Spire is an actin nucleation factor.* Nature, vol. 433, pages 382–388, 2005. (Cité en page 20.)

[Ramon y Cajal 1890] Santiago Ramon y Cajal. *Sobre la aparicion de las expansiones celulares en la medula embrionaria.* Gaceta Sanitaria de Barcelona, pages 413–419, 1890. (Cité en page 7.)

[Rawicz *et al.* 2000] W Rawicz, K C Olbrich, T McIntosh, D Needham et E Evans. *Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers.* Biophysical journal, vol. 79, pages 328–339, 2000. (Cité en pages 50 et 52.)

[Reisler *et al.* 1980] Emil Reisler, Craig Smith et George Seegan. *Myosin minifilaments.* Journal of Molecular Biology, vol. 143, no. 1, pages 129–145, Octobre 1980. (Cité en page 26.)

[Renkin 1954] EM Renkin. *Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes.* The Journal of general physiology, vol. 38, no. 1, pages 225–243, 1954. (Cité en page 63.)

[Reymann *et al.* 2010] Anne-Cécile Reymann, Jean-Louis Martiel, Théo Cambier, Laurent Blanchoin, Rajaa Boujemaa-Paterski et Manuel Théry. *Nucleation geometry governs ordered actin networks structures.* Nature materials, vol. 9, pages 827–832, 2010. (Cité en pages 8 et 36.)

[Reymann *et al.* 2012] Anne-Cécile Reymann, Rajaa Boujemaa-Paterski, Jean-Louis Martiel, Christophe Guérin, Wenxiang Cao, Harvey F Chin, Enrique M De La Cruz, Manuel Théry et Laurent Blanchoin. *Actin network architecture can determine myosin motor activity.* Science (New York, N.Y.), vol. 336, no. 6086, pages 1310–4, Juin 2012. (Cité en page 36.)

[Römer *et al.* 2007] Winfried Römer, Ludwig Berland, Valérie Chambon, Katharina Gaus, Barbara Windschiegl, Danièle Tenza, Mohamed R E Aly, Vincent Fraisier,

Jean-Claude Florent, David Perrais, Christophe Lamaze, Graça Raposo, Claudia Steinem, Pierre Sens, Patricia Bassereau et Ludger Johannes. *Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells.* Nature, vol. 450, no. 7170, pages 670–5, Novembre 2007. (Cité en page 81.)

[Römer *et al.* 2010] Winfried Römer, Léa-Laetitia Pontani, Benoît Sorre, Carles Rentero, Ludwig Berland, Valérie Chambon, Christophe Lamaze, Patricia Bassereau, Cécile Sykes, Katharina Gaus et Ludger Johannes. *Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis.* Cell, vol. 140, no. 4, pages 540–53, Février 2010. (Cité en pages 56, 78, 86, 153 et 165.)

[Rothman & Lenard 1977] J E Rothman et J Lenard. *Membrane asymmetry.* Science (New York, N.Y.), vol. 195, pages 743–753, 1977. (Cité en page 37.)

[Rouiller *et al.* 2008] Isabelle Rouiller, Xiao-Ping Xu, Kurt J Amann, Coumaran Egile, Stephan Nickell, Daniela Nicastro, Rong Li, Thomas D Pollard, Niels Volkmann et Dorit Hanein. *The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex.* The Journal of cell biology, vol. 180, pages 887–895, 2008. (Cité en page 18.)

[Roux *et al.* 2002] Aurélien Roux, Giovanni Cappello, Jean Cartaud, Jacques Prost, Bruno Goud et Patricia Bassereau. *A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 99, pages 5394–5399, 2002. (Cité en page 51.)

[Salbreux *et al.* 2012] Guillaume Salbreux, Guillaume Charras et Ewa Paluch. *Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis.* Trends in Cell Biology, vol. 22, pages 536–545, 2012. (Cité en page 6.)

[Sampson 1891] R. a. Sampson. *On Stokes's Current Function.* Philosophical Transactions of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences, vol. 182, no. January, pages 449–518, Janvier 1891. (Cité en page 65.)

[Sandvig *et al.* 1989] K Sandvig, S Olsnes, J E Brown, O W Petersen et B van Deurs. *Endocytosis from coated pits of Shiga toxin : a glycolipid-binding protein from Shigella dysenteriae 1.* The Journal of cell biology, vol. 108, pages 1331–1343, 1989. (Cité en page 81.)

[Sandvig *et al.* 1992] K Sandvig, O Garred, K Prydz, J V Kozlov, S H Hansen et B van Deurs. *Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum.* Nature, vol. 358, pages 510–512, 1992. (Cité en page 81.)

[Sandvig *et al.* 2014] Kirsten Sandvig, Jonas Bergan, Simona Kavaliauskiene et Tore Skotland. *Lipid requirements for entry of protein toxins into cells.* Progress in lipid research, vol. 54C, pages 1–13, Janvier 2014. (Cité en pages 79, 80, 81 et 82.)

[Saxena *et al.* 1989] S K Saxena, A D O'Brien et E J Ackerman. *Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into Xenopus oocytes.* The Journal of biological chemistry, vol. 264, pages 596–601, 1989. (Cité en page 78.)

[Schafer *et al.* 1996] D A Schafer, P B Jennings et J A Cooper. *Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro : uncapping barbed ends by polyphosphoinositides.* The Journal of cell biology, vol. 135, pages 169–179, 1996. (Cité en page 21.)

[Schlech 2000] W F Schlech. *Foodborne listeriosis.* Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, vol. 31, pages 770–775, 2000. (Cité en page 31.)

[Schultz & Solomon 1961] S G Schultz et a K Solomon. *Determination of the effective hydrodynamic radii of small molecules by viscometry.* The Journal of general physiology, vol. 44, no. 1, pages 1189–99, Juillet 1961. (Cité en page 64.)

[Skoble *et al.* 2001] J Skoble, V Auerbuch, E D Goley, M D Welch et D A Portnoy. *Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and Listeria monocytogenes motility.* The Journal of cell biology, vol. 155, pages 89–100, 2001. (Cité en page 32.)

[Small *et al.* 1978] J V Small, G Isenberg et J E Celis. *Polarity of actin at the leading edge of cultured cells.* Nature, vol. 272, pages 638–639, 1978. (Cité en page 8.)

[Soares *et al.* 2011] Marina Soares, Martin Depken, Björn Stuhrmann et Marijn Korsten. *Active multistage coarsening of actin networks driven by myosin motors.* pages 1–6, 2011. (Cité en page 26.)

[Song *et al.* 1996] L Song, M R Hobaugh, C Shustak, S Cheley, H Bayley et J E Gouaux. *Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore.* Science (New York, N.Y.), vol. 274, no. 5294, pages 1859–66, Décembre 1996. (Cité en pages 46 et 64.)

[Stachowiak *et al.* 2008] Jeanne C Stachowiak, David L Richmond, Thomas H Li, Allen P Liu, Sapun H Parekh et Daniel A Fletcher. *Unilamellar vesicle formation and encapsulation by microfluidic jetting.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 105, pages 4697–4702, 2008. (Cité en page 45.)

[Straub 1943] Ferenc Bruno Straub. *Actin, II.* In Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged, volume 3, chapitre III, pages 23–37. 1943. (Cité en page 12.)

[Suarez *et al.* 2011] Cristian Suarez, Jérémy Roland, Rajaa Boujemaa-Paterski, Hye-ran Kang, Brannon R. McCullough, Anne Cécile Reymann, Christophe Guérin, Jean Louis Martiel, Enrique M. De La Cruz et Laurent Blanchoin. *Cofilin tunes*

the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. Current Biology, vol. 21, pages 862–868, 2011. (Cité en page 22.)

[Suetsugu *et al.* 2010] Shiro Suetsugu, Kiminori Toyooka et Yosuke Senju. *Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteins.* Seminars in Cell and Developmental Biology, vol. 21, pages 340–349, 2010. (Cité en pages 83 et 84.)

[Svitkina *et al.* 1997] T M Svitkina, A B Verkhovsky, K M McQuade et G G Borisy. *Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes : mechanism of cell body translocation.* The Journal of cell biology, vol. 139, pages 397–415, 1997. (Cité en page 7.)

[Svitkina *et al.* 2003] Tatyana M Svitkina, Elena A Bulanova, Oleg Y Chaga, Danijela M Vignjevic, Shin-ichiro Kojima, Jury M Vasiliev et Gary G Borisy. *Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network.* The Journal of cell biology, vol. 160, pages 409–421, 2003. (Cité en page 8.)

[Sykes & Plastino 2010] Cécile Sykes et Julie Plastino. *Cell biology : actin filaments up against a wall.*, 2010. (Cité en page 112.)

[Szent-Györgyi 1945] A. Szent-Györgyi. *Studies on muscle.* Acta Physiol. Scand., vol. 9, no. 25, 1945. (Cité en page 23.)

[Szent-Györgyi 2004] Andrew G Szent-Györgyi. *The early history of the biochemistry of muscle contraction.* The Journal of general physiology, vol. 123, no. 6, pages 631–41, Juin 2004. (Cité en page 23.)

[Theriot *et al.* 1994] Julie A. Theriot, Jody Rosenblatt, Daniel A. Portnoy, Pascal J. Goldschmidt-Clermont et Timothy J. Mitchisont. *Involvement of profilin in the actin-based motility of L. monocytogenes in cells and in cell-free extracts.* Cell, vol. 76, pages 505–517, 1994. (Cité en page 17.)

[Tilney & Portnoy 1989] L G Tilney et D A Portnoy. *Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes.* The Journal of cell biology, vol. 109, pages 1597–1608, 1989. (Cité en page 32.)

[Trachtman *et al.* 2012] Howard Trachtman, Catherine Austin, Maria Lewinski et Rolf A. K. Stahl. *Renal and neurological involvement in typical Shiga toxin-associated HUS*, 2012. (Cité en page 78.)

[Tsai *et al.* 2011] Feng-Ching Tsai, Björn Stuhrmann et Gijsje H Koenderink. *Encapsulation of active cytoskeletal protein networks in cell-sized liposomes.* Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, vol. 27, pages 10061–71, 2011. (Cité en page 40.)

[van der Gucht *et al.* 2005] Jasper van der Gucht, Ewa Paluch, Julie Plastino et Cécile Sykes. *Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement.* Pro-

ceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, pages 7847–7852, 2005. (Cité en pages 33 et 112.)

[van Meer *et al.* 2008] Gerrit van Meer, Dennis R Voelker et Gerald W Feigenson. *Membrane lipids : where they are and how they behave.* Nature reviews. Molecular cell biology, vol. 9, pages 112–124, 2008. (Cité en pages 9 et 11.)

[Vandekerckhove & Weber 1978] J Vandekerckhove et K Weber. *At least six different actins are expressed in a higher mammal : an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide.* Journal of molecular biology, vol. 126, pages 783–802, 1978. (Cité en page 12.)

[Watanabe *et al.* 1997] N Watanabe, P Madaule, T Reid, T Ishizaki, G Watanabe, A Kakizuka, Y Saito, K Nakao, B M Jockusch et S Narumiya. *p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin.* The EMBO journal, vol. 16, pages 3044–3056, 1997. (Cité en page 20.)

[Waugh 1982] R E Waugh. *Surface viscosity measurements from large bilayer vesicle tether formation. II. Experiments.* Biophysical journal, vol. 38, pages 29–37, 1982. (Cité en page 51.)

[Weinberger *et al.* 2013] Andreas Weinberger, Feng-Ching Tsai, Gijsje H Koenderink, Thais F Schmidt, Rosângela Itri, Wolfgang Meier, Tatiana Schmatko, André Schröder et Carlos Marques. *Gel-assisted formation of giant unilamellar vesicles.* Biophysical journal, vol. 105, pages 154–64, 2013. (Cité en page 42.)

[Yang & Svitkina 2011] Changsong Yang et Tatyana Svitkina. *Filopodia initiation : Focus on the Arp2/3 complex and formins*, 2011. (Cité en page 8.)