



HAL
open science

Etapes membranaires de la transduction du signal par les récepteurs couplés aux protéines G : organisation dynamique du récepteur mu aux opioïdes humain à la surface de neuroblastomes.

Aude Karine Sauliere

► **To cite this version:**

Aude Karine Sauliere. Etapes membranaires de la transduction du signal par les récepteurs couplés aux protéines G : organisation dynamique du récepteur mu aux opioïdes humain à la surface de neuroblastomes.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2007. Français. NNT : . tel-00192796

HAL Id: tel-00192796

<https://theses.hal.science/tel-00192796>

Submitted on 29 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER

Ecole Doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III

Discipline : Biophysique

présentée et soutenue

le 20 Juillet 2007

par

Aude SAULIERE

Titre :

**ETAPES MEMBRANAIRES DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL PAR LES
RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G**

**ORGANISATION DYNAMIQUE DU RECEPTEUR μ AUX OPIOIDES HUMAINS A
LA SURFACE DE NEUROBLASTOMES**

Directeur de thèse :

Laurence SALOME

Dominique MASSOTTE (Rapporteur)
Didier MARGUET (Rapporteur)
Jean-Philippe PIN (Examineur)
Laurent MAVEYRAUD (Examineur)

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER

Ecole Doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III

Discipline : Biophysique

présentée et soutenue

le 20 Juillet 2007

par

Aude SAULIERE

Titre :

**ETAPES MEMBRANAIRES DE LA TRANSDUCTION DU SIGNAL PAR LES
RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G**

**ORGANISATION DYNAMIQUE DU RECEPTEUR μ AUX OPIOIDES HUMAINS A
LA SURFACE DE NEUROBLASTOMES**

Directeur de thèse :

Laurence SALOME

Dominique MASSOTTE (Rapporteur)
Didier MARGUET (Rapporteur)
Jean-Philippe PIN (Examineur)
Laurent MAVEYRAUD (Examineur)

*à Lolo,
Trop tôt décédée pour voir cette thèse,*

*à Ghislain,
Venu de si loin.*

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le jury qui a accepté de juger et de corriger mon travail, de plus avec une soutenance durant la période estivale !

Je remercie André Lopez de m'avoir accueillie dans son équipe, et particulièrement pour l'attention qu'il accorde aux questions qu'on lui pose. Je remercie également Laurence Salomé pour la liberté qu'elle m'a laissée dans ce travail, pour l'écoute dont elle a fait preuve dans les moments difficiles, et pour son soutien constant. Merci également d'avoir décalé autant que possible nos réunions l'après-midi

Arrivée à ce stade je ne peux que citer Laurence Cézanne, plus connue sous le surnom de Lolo. Les remerciements ne sont malheureusement plus de mise mais je veux conserver son souvenir vivace et lui garder dans ce travail toute la place à laquelle elle a droit. S'il est vrai que les morts ne meurent vraiment que lorsqu'on les oublie, alors tu es encore là.

Les longues heures / journées / semaines passées aux A3 auraient été bien plus difficiles sans Sergueï. Merci à lui sans qui le FRAP ne serait probablement pas en état de marche ! Je n'oublierai pas de sitôt les heures de tests de son programme ironiquement appelé « EasyFrap ». Merci pour les macros, l'initiation à la programmation ... et les pauses café !

Les p'tites bêtes sur lesquelles j'ai travaillé durant ces quatre années ont été mises en place par Claire Millot et Gérald Gaibelet, merci à eux. Un merci supplémentaire à Claire pour m'avoir enseigné tout l'art de la culture cellulaire et pour les manips complémentaires qu'elle a réalisés.

Merci également aux « extérieurs » qui ont permis la réalisation de cette thèse : Nicolas Destainville, pour les équations et les réflexions SPTesques ; Nacer Benmeradi pour la microscopie électronique et l'intérêt qu'il a porté à mes questions ; et Jean-Louis Druilhe, qui a remis les Peltiers en état de marche.

Il ne faudrait pas oublier les stagiaires qui sont passées entre mes mains lors de ces quatre années et qui ont permis l'avancée de ce travail : les deux Aurélie (Garcia et Sacareau) ainsi que Stéphanie Favarel. Un merci tout particulier à Carolina Varela-Chavez qui a mis en

place le « décapage » des cellules, et, puisque je ne t'ai pas écœuré de la recherche, bonne chance et bon courage pour ta thèse.

Il n'y a pas que le travail dans la vie... je souhaite donc remercier Chantal pour ses rires et son vin (qui n'ont aucun rapport entre eux ...), sans oublier les discussions (longues, longues, longues, ...) et café pris ensemble. Arrivent ensuite les collègues de thèse ... Noëlle mon « mentor » alpha-Tien, Aurore, la réunionnaise de Poitiers (ou la poitevine de la réunion ?), Aurélie, la plus Schtroumpfette et Laurent, le plus ... le plus quoi ?! Merci à lui d'avoir accepté de partager son bureau avec moi, pour les coups de déprime et les crises de rire. Une pensée particulière pour Aurélie, avec qui une amitié improbable, mais que j'espère longue, s'est développée. Peut être un effet secondaire des journées passées dans le noir ? Dans la famille thésard il reste la *p'tite* Chloé, les quelques mois qu'elle a passé ici m'ont déjà permis d'apprécier son caractère ... et l'équation d'Einstein !

Un merci également aux autres membres de l'équipe, plus ou moins permanents : Patrice, Fabrice, Catherine, Michèle, Evert ... Merci encore à Malika, toujours prête à arranger au mieux nos déplacements, et aux services communs de l'IPBS.

Trop nombreux pour être tous cités je voudrais remercier de manière globale les membres actifs de l'association AlphaT. Une pensée particulière pour les trois vénérés présidents sous lesquels j'ai exercé : Mag, Rami et Simon, ainsi qu'aux membres de la com'colloque.

Merci aux enseignants que j'ai pu côtoyer durant mes vacances et mes heures d'ATER pour leur confiance et leur amitié, en particulier aux Auscitains Géraldine, Valérie, Isabelle, Rémi, Robert (mon taxi préféré), Bruno, ...

Je souhaite enfin remercier Geneviève Pratviel qui m'a fait découvrir et aimer la recherche.

Est-il nécessaire de préciser que mes plus sincères remerciements et mes pensées les plus tendres vont à ma famille ?

Pour faire court (et n'oublier personne) : merci à tous ceux qui ont supporté (dans tous les sens du terme) le Schtroumpf grognon que je suis pendant ces quatre années !

*“Whatever we learn from models should be tempered by the fact
that the cells are always right.”*

(Edidin, 2003)

SOMMAIRE

Abréviations
Liste des figures
Avant propos

Chapitre I : Introduction :	
Récepteurs couplés aux protéines G et membrane plasmique	
	1
1 – Les RCPG	3
1.1 – Structure	
1.2 – Classification	5
1.3 – Le cycle de signalisation	6
1.3.1 – La fixation des ligands	
1.3.2 – Les protéines G	8
→ Le trimère	
→ Structure	9
→ Cycle GDP / GTP	10
→ Pré-couplage avec le récepteur	11
1.3.3 – Les effecteurs	12
1.3.4 – Internalisation consécutive à la fixation de l'agoniste	
1.4 – Signalisation sans les protéines G	14
2 – Le récepteur μ dans la famille des récepteurs opioïdes	
2.1 – Préambule	
2.2 – Les différents membres de la famille	15
2.2.1 – Mu, delta et kappa (μ , δ , κ)	
2.2.2 – Le cas particulier d'ORL1	16
2.3 – Les ligands opioïdes	17
2.4 – Les protéines G de liaison	18
2.5 – Effecteurs opioïdes et traitement chronique	19
2.6 – Système de signalisation sans les protéines G	20
2.7 – Dimérisation	
2.7.1 – Au sein de la famille	
2.7.2 – Avec d'autres récepteurs	21
3. La membrane plasmique	22
3.1 – Découverte de la membrane	
3.1.1 – Ses constituants	
3.1.2 – Ses rôles	25
3.1.3 – Les premiers modèles d'organisation membranaire	
3.2 – Complexification des modèles : notions de domaines	26
3.2.1 – DRM ou raft	
→ Découverte	

→ Problèmes soulevés	27
→ Rafts et dynamique	28
3.2.2 – De l'influence du cytosquelette cortical	29
3.2.3 – Interactions entre protéines	32
→ Interactions directes	
→ Interactions à longue distance	
3.3 – La mosaïque membranaire ...	34
4 – Organisation membranaire des RCPG	36
4 1 – Premiers modèles de rencontre des partenaires	
4 2 – Analyse de la diffusion des RCPG	37
4.2.1 – A l'état basal	
4.2.2 – Origine des diffusions observées	38
4.2.3 – Effets des ligands	40
5 – But de l'étude	41

Chapitre II : Techniques :
Principes et instrumentations des deux techniques utilisées pour l'étude de
l'organisation membranaire du récepteur μ

	43
1 – Le retour de fluorescence après photoblanchiment : FRAP	45
1.1 – Principe	
1.2 – Le FRAP à rayon variable : FRAPrv	47
1.3 – Détermination des paramètres	
1.3.1 – Analyse individuelle des retours de fluorescence	
1.3.2 – Analyse par rayon	48
→ La fraction mobile	
→ Le coefficient de diffusion	49
→ Tailles relatives de la cellule, de la zone d'observation et des domaines	50
→ Erreur sur les paramètres	51
1.1.3 – Analyse à deux populations	
1.4 – Montage et conditions d'expériences	52
1.4.1 – Montage	
1.4.2 – Limites et contrôles afférents à la technique	54
1.4.3 – Extrapolation du point I_{PB}	55
1.4.4 – Analyse sur système modèle	
2 – Le suivi de particule unique : SPT	56
2.1 – Principe	
2.1.1 – Principe général	
2.1.2 – Différents types de marquage des molécules d'intérêts	
2.2 – Montage	57
2.2.1 – Le contraste de Nomarski	
2.2.2 – Appareillage utilisé	58

2.2.3 – Détection des particules d'or	60
→ En post-traitement	61
→ En temps réel	62
2.3 – Les colloïdes d'or	63
2.3.1 – Concentration stabilisatrice	
2.3.2 – Fonctionnalisation <i>simple couche</i> et problèmes rencontrés	
2.3.3 – Problème relatif à la présence de vésicules	65
2.3.4 – fonctionnalisation <i>double couche</i> et résolution des problèmes	66
2.4 – Analyse des trajectoires	68
2.4.1 – Le déplacement quadratique moyen	
→ Calcul	
→ Le D_{1-2}	69
→ Différents types de diffusion simples	
2.4.2 –Détection des zones de confinements	71
→ Algorithmes de Simson et Saxton	
→ Modification de l'algorithme	72
→ Détection des sauts entre domaines	75
2.4.3 – Résolutions spatiale et temporelle	76
→ Limites de résolution	
→ Critères de reconnaissances des colloïdes immobiles	77

Chapitre III : La lignée cellulaire SH-SY5Y surexprimant T7-EGFP-hMOR : pharmacologie du récepteur et caractéristiques des cellules

	81
1 – La lignée cellulaire : les SH-SY5Y	83
1.1 – La lignée sauvage	
1.2 – La lignée transfectée stable	84
2 – Tests de fonctionnalité	86
2.1 – Liaison des ligands	
2.2 – Transmission du signal à l'adénylate cyclase	88
2.2.1 – Inhibition de l'adénylate cyclase	
2.2.2 – Effet de la toxine pertussique	
3 – Environnement lipidique	92
4 – Internalisation due aux ligands	95
4.1 – Littérature	
4.2 – Résultats	96
5 – Le cytosquelette	97
6 – Fluorescence totale des cellules et survie cellulaire	99
7 – Le glycocalyx	100
8 – Présence du récepteur dans les DRMs ?	102

Chapitre IV :
Analyse par FRAPrv et SPT de la diffusion latérale de T7-EGFP-hMOR

	105
1 – Analyse à l'état basal	107
1.1 - Organisation à température ambiante	
1.1.1 – Analyse par FRAP à rayon variable	
→ Résultats	
→ Modèles d'organisation latérale	109
1.1.2 – Influence du glycocalyx	111
→ Premiers résultats de SPT	
→ Effet du glycocalyx sur la diffusion de μ^* observée par FRAPrv	112
1.1.3 – Analyse en SPT, après dégradation du glycocalyx	113
→ Les différents modes de diffusion observés	
→ Les trajectoires confinées	116
→ Variations du coefficient de diffusion avec la taille des domaines	117
→ Comparaison des résultats en présence et en absence du glycocalyx	120
1.1.4 – Un modèle d'organisation pour le récepteur μ^* à 22°C	121
1.2 – Effet de la modulation de la température	122
1.2.1 – Analyse par FRAPrv *	
→ Diminution de la température : analyse à 14°C	
→ Augmentation de la température : analyse à 37°C	123
1.2.2 – Analyse par SPT à 37°C	124
1.2.3 – Diffusion de sondes lipidiques, analyse par FRAPrv	127
→ Résultats	128
→ Comparaison avec la littérature	129
1.2.4 – Un modèle d'organisation pour le récepteur μ^* à 37°C	130
1.3 – Influence du cytosquelette d'actine sur la diffusion de μ^*	133
1.3.1 – Etude en fonction de la température par FRAPrv	
1.3.2 – Etude à température ambiante par SPT	136
1.3.3 – Comparaison des résultats et modèle d'organisation	139
1.4 – Influence des protéines G sur la diffusion de μ^* : étude en fonction de la température par FRAPrv	140
1.4.1 – Dynamique des récepteurs μ^* à 22°C	
1.4.2 – Dynamique des récepteurs μ^* à 14°C	141
1.4.3 – Dynamique des récepteurs μ^* à 37°C	142
1.4.4 – Origine des domaines et modèle d'organisation	143

2 – Analyse par FRAPrv de la dynamique de μ^* en présence de ligands	145
2.1 – Effet des antagonistes	
2.2 – Effet des agonistes	146
2.2.1 – La morphine	
→ Effet de la morphine sur l'organisation de μ^*	
→ Origine de ces domaines	148
→ Modèle d'organisation des récepteurs μ^* activés par la morphine	149
2.2.2 – Le DAMGO	150
→ Effet du DAMGO sur l'organisation de μ^*	
→ Analyse à deux populations et modèle d'organisation	152
→ Origine de ces domaines	154
2.2.3 – Comparaison de l'effet des deux agonistes sur l'organisation membranaire de μ^*	155

Chapitre V : Conclusions et Perspectives

157

Références bibliographiques

167

Annexes

Matériel et méthodes	187
Articles	201
“Diffusion of the mu opioid receptor at the surface of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is restricted to permeable domains.”	
“Functional membrane diffusion of G-protein coupled receptors.”	

ABREVIATIONS

AR	acide rétinoïque
AC	adenylyl cyclase
ADN	acide desoxyribonucléique
AMPC	adenosine monophosphate cyclique
B_{max}	nombre total de site de liaison
BSA	albumine de sérum bovin
CD	cytochalasine D
CHO	cellules d'ovaires de hamster chinois
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CTAP	peptide D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH ₂
D	coefficient de diffusion
δ , DOR	récepteur delta opioïde
DAMGO	peptide [D-Ala ² ,N-Me-Phe ⁴ ,Gly-ol ⁵]-enkephaline
DIC	contraste différentiel interférentiel
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i> (cf. matériels et méthodes)
DO	densité optique
DPN	diprénorphine
DRM	<i>detergent resistant membrane</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FCS	spectroscopie à corrélation de fluorescence
FRET	Transfert d'énergie par résonance de type Förster (<i>Fluorescence / Förster Resonance Energy Transfert</i>)
GDP/GTP	guanine diphosphate / guanine triphosphate
GM1	ganglioside
GPI (ancree)	ancree glycosylphosphatidylinositol
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i>
K_d	constante de dissociation
K_i	constante d'inhibition
κ / KOR	récepteur kappa opioïde
μ / MOR	récepteur mu opioïde
μ^*	récepteur transfecté T7-EGFP-hMOR
HEK	<i>human embryonic kidney</i> (cellules embryonnaires de rein humain)
hMOR	récepteur mu opioïde humain
NBD	N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)
NOP / ORL1	récepteur à la nociceptine / <i>opioid like receptor</i>
NRK	<i>normal rat kidney</i> : fibroblastes de rein de rat
PBS	tampon phosphate
PC	phosphatidylcholine
PE	-----ethanolamine
PI	-----inositol
PIP ₂	-----inositol-diphosphate
PS	-----serine
PTX	toxine pertussique
r	rayon des domaines
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
ROI	<i>region of interest</i> : zone de travail sur une image
SH-SY5Y	lignée de neuroblastomes

SM	sphingomyéline
SMT	<i>single molecule tracking</i> : suivi de molécule unique
SVF	sérum de veau foetal
T7	peptide signal (11 acides aminés)
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TX100	détergent triton X-100

Abréviations FRAP

c	rayon de la cellule
D_{exp}	coefficient de diffusion expérimental
$D_{\text{réel}}$	----- réel, recalculé à partir de D_{exp}
D_{libre}	----- réel à longue distance
D_{conf}	----- réel dans les domaines
FRAP	retour de fluorescence après photoblanchiment
FRAPrv	----- à rayon variable
F(t)	----- normalisé
I (t)	intensité de fluorescence en fonction du temps
M	fraction mobile
M_{I}	fraction immobile
M_{P}	fraction mobile permanente
P	proportion de chaque population
PM	photomultiplicateur
R	rayon de la zone d'observation
$\tau_{1/2}$	temps de demi-retour

Abréviations SPT

D_{micro}	coefficient de diffusion microscopique
D_{MACRO}	coefficient de diffusion macroscopique
D_{1-2}	coefficient de diffusion calculé par la pente à l'origine de la MSD
I	index de probabilité de confinement (algorithme de Simson)
I_{c}	valeur seuil de l'index de confinement (algorithme de Simson)
L	taille des domaines (relié à r par l'équation 19bis)
Λ	index de probabilité de confinement (algorithme de Destainville)
Λ_{c}	valeur seuil de l'index de confinement (algorithme de Destainville)
$\text{MSD}_{\delta t}$	déplacement quadratique moyen en fonction du temps
N	nombre total de points de la trajectoire
S	segment glissant
SPT	<i>single particle tracking</i> : suivi de particule unique
v	vitesse des diffusions dirigées

Liste des figures

1 -	Schéma de la structure 2D d'un RCPG dans la membrane.....	4
2 -	Structure 3D de la rhodopsine à haute résolution (2,8Å).....	4
3 -	Deux modèles de dimérisation de deux récepteurs chimériques.....	6
4 -	Vue schématique des étapes membranaires de transduction du signal par les RCPG.	7
5 -	Différentes acylations portées par les protéines G.....	9
6 -	Structure 3D de la rhodopsine et de sa protéine G, la transducine.....	10
7 -	Cycle d'activation / désactivation des protéines G.....	11
8 -	Vue schématique de l'internalisation d'un RCPG.....	13
9 -	Structure 2D supposée du récepteur mu opioïde.....	16
10 -	Les quatre ligands utilisés dans ce travail.	17
11 -	Représentation schématique des protéines G_{α} connues pour interagir avec les différents types de récepteurs opiacés.....	19
12 -	Structure générale des phospholipides et principales têtes polaires.....	23
13 -	Schéma de la membrane plasmique.	24
14 -	Schéma d'un raft.....	27
15 -	Modèle « barrières et piquets ».....	31
16 -	Modèle de confinement sans barrière.....	33
17 -	Schéma des clusters induits par le cross-link des GPIAP.....	35
18 -	Retour de fluorescence en fonction du temps.....	46
19 -	Fraction mobile en fonction de l'inverse du rayon d'observation.....	49
20 -	Simulations réalisées dans Salomé <i>et coll</i> , 1998.....	49
21 -	Montage du FRAPrv.....	53
22 -	Chemin suivi par la lumière dans un montage en contraste différentiel interférentiel.....	58
23 -	Microscope Axioplan 2 utilisé pour les expériences de SPT.....	59
24 -	Dispositif de SPT.....	60
25 -	Traitement d'une image par la station de numérisation (post-traitement).....	61
26 -	Premières étapes de la détermination des coordonnées du centre du colloïde par la méthode de convolution.	62
27 -	Colloïde et vésicules observés en DIC.....	65
28 -	Représentation du calcul de la $MSD_{\delta t}$	69
29 -	$MSD_{\delta t}$ simulées pour les différents types de diffusion simple.....	71
30 -	Test de confinement effectué sur un court segment de la trajectoire analysée.....	72
31 -	Schéma représentant l'analyse de la trajectoire par segment glissant.....	74
32 -	Profil de probabilité de confinement obtenu pour une trajectoire simulée présentant deux confinements.....	74
33 -	Exemple type de colloïde immobile, à 22°C.....	78
34 -	Représentation schématique du vecteur d'expression pRC/CMV/SP-T7-EGFP	

-hMOR utilisé pour transfecter les SH-SY5Y.....	85
35 - Caractérisation des cellules exprimant T7-EGFP-hMOR.....	85
36 - Structure cristallographique de la toxine pertussique.....	89
37 - Mécanisme d'ADP ribosylation de la sous-unité alpha des protéines $G_{i/o}$ par la toxine pertussique.....	89
38 - Pourcentage d'inhibition (ou de stimulation) de l'adenylyl cyclase en fonction des conditions d'incubations des cellules avec les agonistes indiqués....	91
39 - Ratio des trois constituants membranaires principaux sur la lignée exprimant T7-EGFP-hMOR et sur la lignée sauvage	92
40 - Pourcentage des différentes têtes polaires présentes dans les membranes de cellules exprimant T7-EGFP-hMOR et de cellules sauvage	93
41 - Visualisation en microscopie de fluorescence des cellules exprimant T7-EGFP-hMOR et après insertion de lipides DiC _{12:0} -PE-rhodamine.....	94
42 - Cellules SH-SY5Y exprimant T7-EGFP-hMOR observée au microscope de fluorescence après ajout de différents ligands	97
43 - Marquage du cytosquelette par la phalloïdine rhodamine.....	98
44 - Effet du DAMGO sur l'internalisation de T7-GFP-hMOR après traitement à la CD.....	99
45 - Pourcentage relatif de fluorescence due à l'EGFP en cytométrie de flux.....	100
46 - Observation des SH-SY5Y en microscopie électronique à transmission.....	102
47 - Analyse des DRM.	103
48 - Ajustement selon une population du regroupement de 9 campagnes de mesure sur cellules à l'état basal, à 22°C.	108
49 - Différents modèles simples d'organisation membranaire.....	110
50 - Résultats obtenus en FRAPrv sur les cellules pré-traitées à la neuraminidase.....	113
51 - Trajectoires typiques des différents modes de diffusion rencontrés, et MSD _{dt} correspondantes	114
52 - Répartition des 98 trajectoires obtenues en SPT (à 22°C) en fonction de leur mode de diffusion.....	115
53 - Comparaison en log-log des coefficients de diffusion D_{1-2} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) et D_{micro} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) des trajectoires obtenues à 22°C.....	116
54 - Répartition des 52 trajectoires confinées en fonction des tailles de domaines.....	116
55 - Représentation en log-log des coefficients de diffusion D_{micro} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) en fonction de la taille L des domaines (μm).....	118
56 - Représentation en log-log des coefficients de diffusion D_{1-2} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) en fonction de la taille L de domaines (μm).....	119
57 - Modèle d'organisation des récepteurs μ^* à 22°C.	122
58 - Fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation pour une expérience sur des cellules observées à 22°C ou à 14°C	123
59 - Fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation sur des cellules observées à 22°C ou à 37°C	123

60 -	Proportion des quatre types de diffusion pour les trajectoires à 37°C	124
61 -	Schéma de la sonde lipidique utilisée : C ₁₂ -PE-NBD	128
62 -	Modèle d'organisation des récepteurs μ^* à 37°C.....	132
63 -	Fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation des cellules traitées à la cytochalasine D et analysées à trois températures	135
64 -	Proportion des quatre types de diffusion pour les trajectoires obtenues après traitement des cellules à la cytochalasine D, à 22°C.....	136
65 -	Répartition des trajectoires confinées en fonction des tailles de domaines, sur cellules traitées à la cytochalasine D et sur cellules témoins, à 22°C	138
66 -	Fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation pour les cellules témoins et les cellules traitées à la PTX, à 22°C	141
67 -	Fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation pour les cellules traitées à la PTX et observées à 22°C ou à 14°C	141
68 -	Fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation pour les cellules traitées à la PTX et observées à 22°C ou à 37°C	142
69 -	Fraction mobile et coefficient de diffusion des analogues lipidiques C ₁₂ -PE-NBD insérés dans la membrane de cellules préalablement traitées à la cytochalasine D ou à la toxine pertussique (22°C)	143
70 -	Fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation pour les cellules à l'état basal ou traitées à la morphine.....	147
71 -	Fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation pour les cellules à l'état basal ou traitées à la PTX et en contact avec la morphine	148
72 -	Schéma de l'organisation membranaire du récepteur μ^* à l'état basal et après activation par la morphine	150
73 -	Fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation pour les cellules à l'état basal ou en contact avec le DAMGO	151
74 -	Schéma de l'organisation membranaire du récepteur μ^* à l'état basal et après activation par le DAMGO	153

Liste des tableaux

1 - Résumé bibliographique des résultats obtenus pour la recherche d'homo- et hétéro- dimères dans la famille des récepteurs opioïdes.....	21
2 - Tableau de référence pour le choix des diaphragmes d'entrée et de sortie, et de la lentille en fonction de la taille de la zone d'observation souhaitée.....	54
3 - Valeurs en nm correspondant à 1 pixel sur l'axe des x et des y en fonction du mode de traitement des images.....	60
4 - Détermination du pourcentage de fixation non spécifique pour différentes concentrations d'anticorps T7 sur cellules transfectée	64
5 - Détermination du pourcentage de fixation non spécifique des colloïdes fonctionnalisés en <i>double couche</i> sur les cellules exprimant T7-EGFP-hMOR...	66
6 - Nombre de colloïdes (fonctionnalisé spécifiquement) fixé par cellule (exprimant T7-EGFP-hMOR) en fonction des conditions d'incubation de la neuraminidase et de la concentration en anticorps anti-T7.....	67
7 - Ecart-types en x et en y obtenus à partir de 30 trajectoires de colloïdes immobiles, par les deux méthodes de détection en temps réel.....	76
8 - Paramètres pharmacologiques obtenus pour les ligands testés dans trois lignées...	86
9 - Pourcentage relatif des différentes chaînes d'acides gras présentes dans les membranes de cellules sauvages et transfectées.....	94
10 - Paramètres obtenus selon l'ajustement à une ou à deux populations du regroupement global des retours de fluorescence des cellules à l'état basal	109
11 - Comparaison des différents paramètres obtenus pour les trajectoires du récepteur μ^* sur cellules ayant conservé, ou non, leur glycocalyx.....	120
12 - Comparaison des proportions et des moyennes des coefficients de diffusion de chaque mode de diffusion à 22°C et 37°C.....	125
13 - Comparaison des paramètres obtenus en FRAPrv sur cellules traitées à la CD et observées à trois températures différentes	134
14 - Comparaison des proportions et des coefficients de diffusion moyens D_{1-2} et D_{micro} pour les trajectoires obtenues sur cellules témoins et sur cellules dont le cytosquelette a été détruit, à 22°C.....	137
15 - Paramètres obtenus en FRAPrv sur cellules traitées à la PTX ou non, à 22°C	140
16 - Paramètres obtenus en FRAPrv sur cellules traitées à la PTX observées à 22°C et 37°C.....	143
17 - Paramètres obtenus en FRAPrv pour les récepteurs μ^* incubés ou non avec l'antagoniste CTAP	145
18 - Paramètres obtenus en FRAPrv pour les récepteurs à l'état basal ou traités à la morphine.....	147
19 - Paramètres obtenus pour l'analyse en FRAPrv des récepteurs à l'état basal ou en contact avec de la morphine sur cellules pré-traitées, ou non, à la PTX	149

20 - Paramètres obtenus pour l'analyse en FRAPrv des récepteurs à l'état basal, ou en contact avec du DAMGO	152
21 - Paramètres obtenus par ajustement à une ou à deux populations du regroupement des retours de fluorescence obtenus après mise en contact des récepteurs avec le DAMGO, à 14°C	152

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse se situe à l'interface de la biologie et de la physique. L'union de ces deux disciplines s'est révélée particulièrement intéressante tant au niveau de la problématique qu'au niveau de l'enrichissement scientifique personnel occasionné.

Contexte général

La problématique biologique de cette étude porte sur l'organisation latérale de la membrane en lien avec les fonctions des protéines insérées. Le premier modèle moderne d'organisation latérale est celui dit *de la mosaïque fluide* de Singer et Nicolson, en 1972. Contrairement à ce qui est postulé dans ce modèle il est aujourd'hui admis que la diffusion des constituants membranaires n'est pas libre dans la membrane, en particulier à cause des hétérogénéités de composition et de distribution des composants de la membrane. Des études biochimiques suggèrent également que les protéines et lipides membranaires sont organisés en domaines. Ces derniers permettraient soit une proximité spatiale pour favoriser la rencontre de protéines partenaires, soit au contraire une séparation afin d'éviter l'interaction de certaines protéines.

La question qui est au cœur de ce champ de recherche est de comprendre l'origine d'une telle organisation et l'intérêt fonctionnel pour les protéines impliquées. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont de bons modèles d'étude car ils nécessitent la rencontre au niveau de la membrane de plusieurs partenaires (récepteur, protéine G, effecteur). La spécificité et l'efficacité de transmission du signal dont ils font preuves laisse supposer qu'ils sont organisés en domaines dans la membrane. La caractérisation de ces domaines, appelés *plates-formes de signalisation*, est donc un challenge de l'étude des membranes biologiques. C'est pourquoi les techniques de biophysiques telles que le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et le suivi de particule unique (SPT et SMT) sont utilisées depuis une quinzaine d'années pour l'analyse de la diffusion de différents RCPG.

Problématique de l'équipe

Parmi les RCPG, l'équipe « organisation et dynamique fonctionnelles des membranes biologiques », dans laquelle j'ai effectué ce travail, s'intéresse particulièrement à la famille des récepteurs opioïdes et, en son sein, au récepteur mu (hMOR). L'objectif de cette équipe est de déterminer l'influence de l'environnement membranaire sur l'activité du récepteur et de

relier son organisation dynamique membranaire avec sa fonction. Des analyses biochimiques précédentes ont révélé la présence du récepteur dans des domaines enrichis en cholestérol ainsi que l'importance de ce stérol pour la fonctionnalité de hMOR (modulation de l'affinité envers les ligands). De plus la présence du récepteur dans ces domaines a été mise en relation avec l'activation par les ligands et la capacité de liaison des protéines G. Des études de dynamique par SPT ont également été réalisées et ont révélées que la diffusion de hMOR était compartimentée. L'origine de cette diffusion particulière semble être les interactions à longue distance entre protéines mais son lien avec la fonction du récepteur reste indéterminé.

La mise en commun de tous ces résultats est difficile à cause des systèmes cellulaires différents qui ont été utilisés (levure, CHO, NRK). Ils permettent difficilement de comprendre l'origine de tels domaines, ainsi que leur rôle dans la fonction du récepteur.

Le but de cette thèse était donc d'obtenir une vue globale de l'organisation latérale de hMOR en utilisant différentes approches sur un même système cellulaire, pertinent pour la fonction du récepteur. L'étude de la dynamique a été effectuée par deux techniques complémentaires : le FRAPrv (mesure d'ensemble) et le SPT (mesure individuelle). Les origines de l'organisation membranaire de hMOR ont été recherchées. La compréhension de cette organisation pour la fonction du récepteur, en particulier par rapport aux voies d'endocytose et de transduction du signal a également été explorée. L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de mettre en place un modèle d'organisation du récepteur mu opioïde humain dans son environnement.

Plan du manuscrit

La description de la famille des récepteurs couplés aux protéines G ainsi que les connaissances actuelles sur l'organisation dynamique de la membrane plasmique sont exposées dans le premier chapitre (p. 1). Les différents modèles d'organisation membranaire proposés à l'heure actuelle sont également décrits, ainsi qu'un état des lieux des connaissances obtenues sur la diffusion des RCPG.

Les deux techniques utilisées (FRAPrv et SPT) sont présentées dans le second chapitre (p. 43). Les principes d'analyses de données développés dans l'équipe, ainsi que les problèmes rencontrés lors de leur mise en place sont également détaillés.

La première étape de ce travail a consisté en la mise en place d'un système cellulaire pertinent pour l'analyse dynamique souhaitée. Il a été nécessaire de prendre en compte les impératifs liés aux techniques en particulier le marquage des récepteurs ainsi que leur taux

d'expression. La caractérisation de la lignée stable de neuroblastomes utilisée dans ce travail ainsi que l'étude pharmacologique du récepteur sont décrits dans le troisième chapitre (p. 81).

Enfin l'étude de la dynamique du récepteur est développée dans le quatrième chapitre (p. 105). Les analyses ont été réalisées pour le récepteur à l'état basal à différentes températures, ainsi qu'en présence de différentes drogues (toxine pertussique, cytochalasine D). Pour chaque condition testée, les résultats obtenus par les deux techniques sont présentés successivement puis discutés en les comparant. Enfin l'analyse de la dynamique du récepteur avec ses ligands (réalisée uniquement par FRAPrv) est décrite et discutée.

Le dernier chapitre (p. 157) fait la synthèse des résultats obtenus et développe les perspectives de ce travail.

Chapitre I

INTRODUCTION

Récepteurs couplés aux protéines G et membrane plasmique

Ce chapitre va s'attacher à introduire les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et la membrane plasmique. Il s'amorcera avec la présentation desdits récepteurs, avant d'aborder les particularités des récepteurs opioïdes, notamment celles du récepteur mu. La membrane plasmique, qui est l'environnement immédiat de ces récepteurs, sera ensuite décrite dans sa composition et dans son organisation latérale. Au terme de cette description les notions de dynamique, de diffusion et de compartimentation membranaire seront développées. Les différentes causes supposées de cette organisation, et les différents modèles membranaires associés, seront traités. Pour finir ce chapitre une synthèse bibliographique sera faite sur la dynamique latérale des RCPG déjà étudiés dans la littérature.

1 – Les RCPG

Quel que soit le point de vue choisi, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) s'imposent comme la plus grande famille de récepteurs membranaires. Ils sont présents chez les plantes, les levures, les insectes, les nématodes, les vertébrés et sont codés par une des plus grandes familles de gènes : 1% du génome de *Drosophila*, plus de 5% de celui de *Caenorhabditis elegans*. Chez l'homme près de 1% du génome code pour 1000 à 2000 RCPG qui ont des implications dans toutes les grandes voies de signalisation membranaire. La diversité de leurs fonctions démontre également l'importance de cette famille (Bockaert, 1999; Kenakin, 2002; Marinissen, 2001; Pierce, 2002). Bien qu'ayant une structure-cœur commune, ils ont la capacité de lier spécifiquement des ligands de natures très différentes (du photon au peptide, des hormones aux molécules odorantes) et de transmettre dans chaque cas l'information à la cellule. Cette implication dans des processus multiples a naturellement fait d'eux une cible pharmacologique privilégiée. A ce jour plus de 50% des médicaments mis sur le marché sont des ligands de RCPG et traitent des pathologies aussi diverses que l'asthme, l'hypertension, les allergies ou la migraine.

1.1 – Structure

Le couplage aux protéines G hétérotrimériques intracellulaires est la première caractéristique commune de cette famille, d'où leur nom. Ils sont également appelés couramment *récepteurs à 7 domaines transmembranaires* car ils possèdent tous une structure avec 7 hélices α traversant la membrane plasmique. Les boucles du côté extracellulaire sont appelées e1, e2 et e3 ; et celles du côté interne i1, i2 et i3. Un pont disulfure (présent chez la majorité des RCPG) relie e1 et e2. Des sites de glycosylation potentiels sont situés sur l'extrémité N- terminale externe. L'extrémité C-terminale interne peut former une pseudo-boucle 4 (i4) par l'intermédiaire d'une ancre lipidique (fig. 1) (Bockaert, 1999).

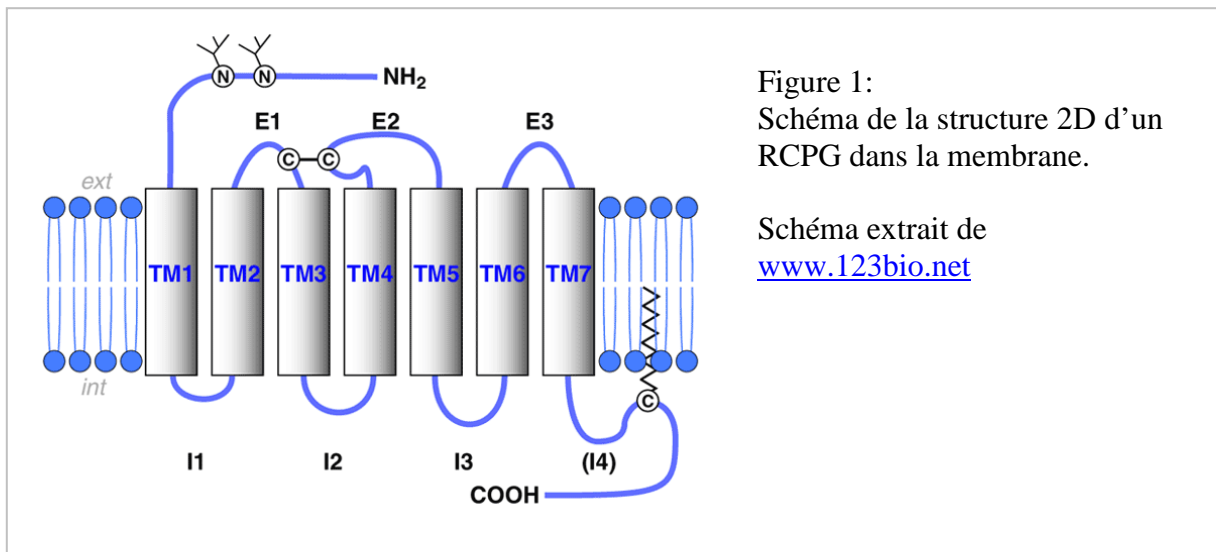


Figure 1:
Schéma de la structure 2D d'un RCPG dans la membrane.

Schéma extrait de www.123bio.net

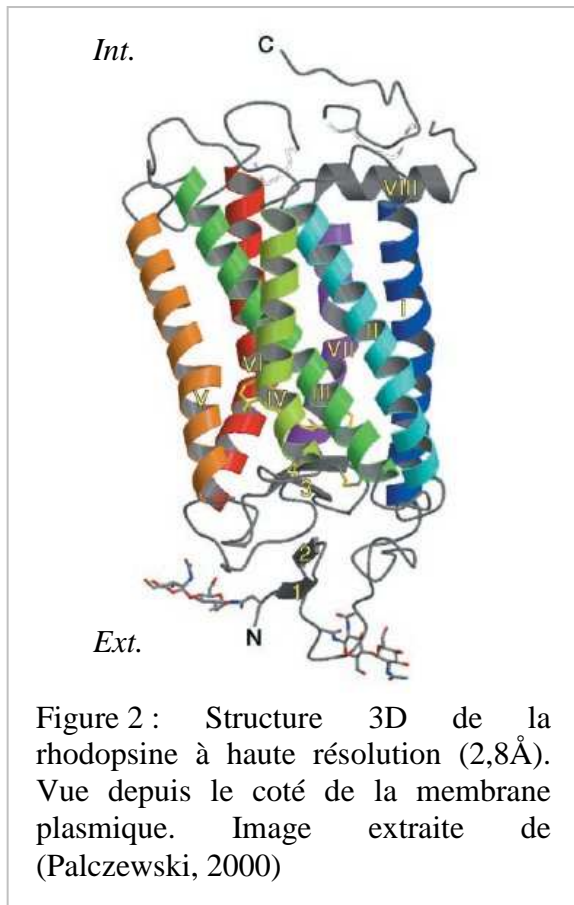


Figure 2 : Structure 3D de la rhodopsine à haute résolution (2,8Å). Vue depuis le côté de la membrane plasmique. Image extraite de (Palczewski, 2000)

Au-delà de cette structure commune, les RCPG varient surtout par la longueur de leurs extrémités C- et N-terminales, par la composition en acides aminés de ces dernières, et celle des boucles externes et internes (Bockaert, 1999). Cette disparité est à la base de la différence de propriété de liaison des différents récepteurs, que ce soit au niveau des ligands ou des protéines intracellulaires.

La structure 3D des RCPG reste à ce jour mal connue. Cela est dû à deux difficultés principales : d'une part la purification non dénaturante, d'autre part la cristallisation de ces protéines membranaires. Seule celle de la rhodopsine a été déterminée à haute résolution (Palczewski, 2000), et ce, grâce à la concentration importante naturelle de ce

récepteur dans les membranes des cellules de la rétine (fig. 2). Elle sert de base aux modèles moléculaires des autres RCPG grâce aux homologies de séquence et aux extrapolations de structure obtenues suite aux remplacements des acides aminés différents (Chaturvedi, 2000).

1.2 – Classification

L'analyse des séquences, et la nature des ligands, ont permis de regrouper les RCPG en trois familles :

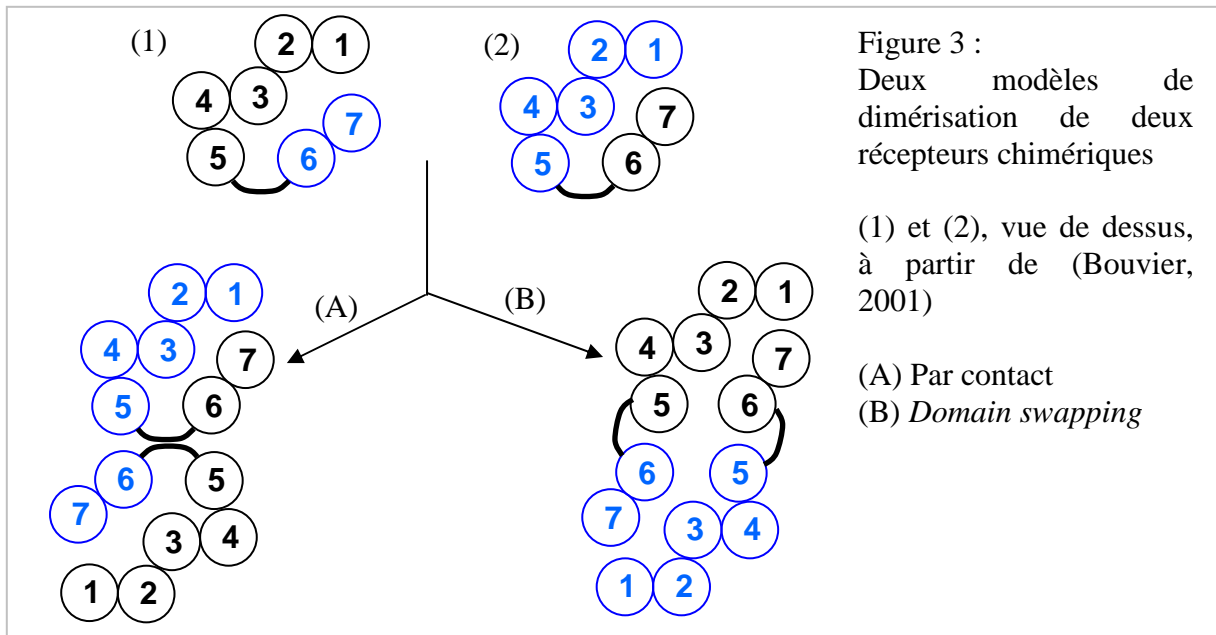
- La première regroupe la grande majorité des récepteurs, notamment tous les récepteurs odorants qui constituent à eux seuls la moitié des RCPG. Les récepteurs qui la composent sont activés par des ligands de petite taille (peptide, hormone, molécules chimiques odorantes, etc.). Ils peuvent se fixer sur trois sites différents qui définissent trois sous-familles : dans une cavité constituée par les hélices 3 et 6 (famille 1a) ou au niveau de l'extrémité N-terminale assez courte et des boucles externes (1b). Dans le cas 1c la queue N-terminale est plus longue et constitue le site d'interaction avec le ligand.

- La seconde famille regroupe les RCPG qui ont un domaine extracellulaire plus grand et qui sont activés par des ligands de taille plus importante.

- Les membres de la troisième famille possèdent une extrémité N-terminale encore plus volumineuse, et surtout très organisée. Cette structure en forme de double-lobe constitue la poche de fixation du ligand (Bockaert, 1999).

Ces récepteurs ont d'abord été considérés uniquement sous forme monomérique. Mais la découverte du récepteur au glutamate GABA_B, exprimé à la membrane et actif uniquement sous forme dimérique (White, 1998), a ouvert un nouvel axe de recherche. La dimérisation, ou même l'oligomérisation, des RCPG a par la suite été recherchée par des études d'immunoprécipitation ou bien grâce à l'utilisation de chimères. Cette dernière méthode consiste à former un RCPG chimérique en fusionnant les cinq premières hélices d'un premier récepteur avec les deux dernières hélices d'un deuxième (fig. 3 (1)). Le récepteur inverse est également construit (fig. 3 (2)). Chacun de ces récepteurs chimériques exprimé seul n'est pas actif, mais la co-expression des deux chimères rétablit leurs fonctionnalités respectives, ce qui montre une coopérativité au niveau moléculaire (Maggio, 1993). Enfin les techniques de transfert d'énergie de fluorescence ou de bioluminescence (FRET et BRET) sont également utilisées pour rechercher une proximité des récepteurs dans les membranes de cellules (Angers, 2000).

Deux principaux modèles ont été proposés pour la formation de ces dimères, mettant principalement en jeu les hélices 5 et 6 (Bouvier, 2001; Gouldson, 2000). Soit il y a formation par simple contact (figure 3 (A)), soit ils « échangent » leurs hélices respectives (*domain swapping* figure 3 (B)).



Le rôle de la dimérisation des récepteurs sur leur fonction est encore mal connu. Il apparaît néanmoins que cette mise en commun modifie les paramètres pharmacologiques des récepteurs impliqués, ainsi que leur signalisation et même leur trafic à la membrane (Rios, 2001). La formation de structures plus complexes (trimère, tétramère, oligomère) n'est pas non plus à exclure.

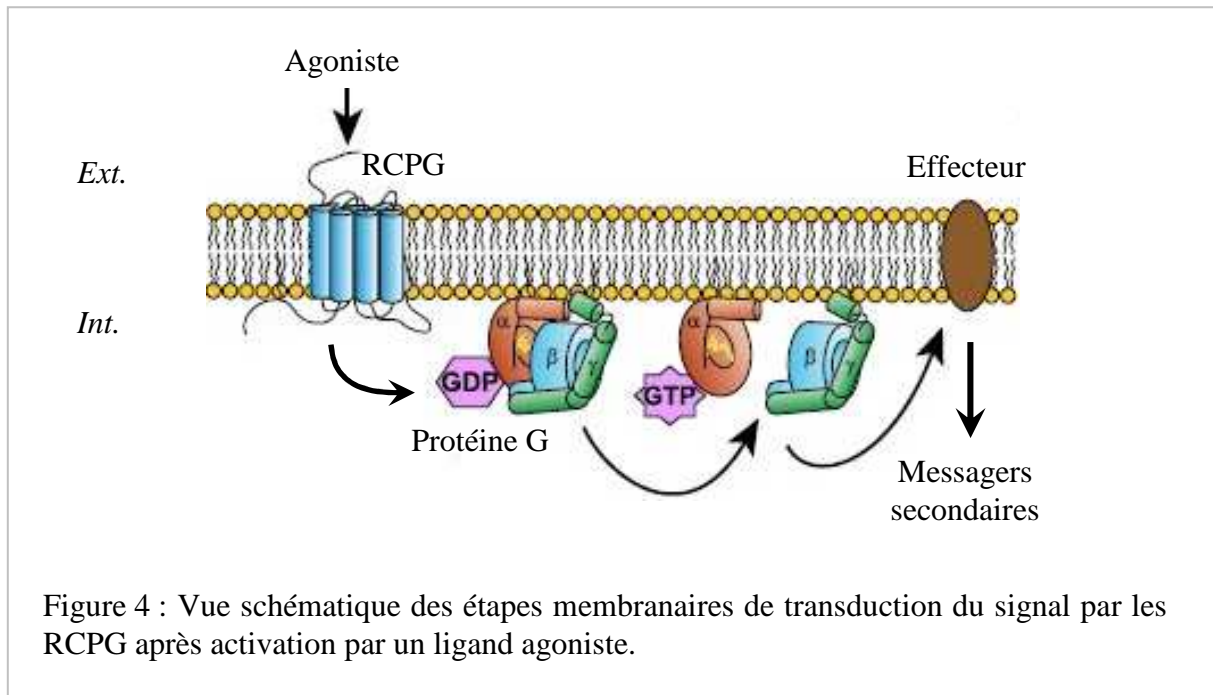
1.3 – Le cycle de signalisation

Le cycle de signalisation débute par la liaison de l'agoniste sur le site de fixation du récepteur. Cela entraîne l'activation des protéines G, c'est-à-dire l'échange du GDP par un GTP au niveau de la sous-unité α , qui se sépare alors du dimère $\beta\gamma$. Les sous-unités α et $\beta\gamma$ vont alors interagir avec leurs effecteurs et moduler leurs activités. L'hydrolyse du GTP met fin à l'association de la sous-unité α avec son effecteur, ce qui permet de reconstituer la protéine G hétérotrimérique (fig. 4). La liaison de l'agoniste entraîne également l'activation de kinases spécifiques. Ces dernières phosphorylent le récepteur activé, induisant son internalisation par les puits de clathrine, entraînant l'arrêt de la réponse (cf. chapitre I, §1.3.4).

1.3.1 – La fixation des ligands

Le modèle du complexe ternaire (ligand-récepteur-protéine G) postule que le récepteur peut être dans deux états pharmacologiques appelées R et R*, respectivement inactif et actif. L'antagoniste est capable de se lier aux deux formes alors que l'agoniste ne se lie qu'à la

forme active (De Lean, 1980; Samama, 1993). Ces états ne sont pas définis de manière structurale, et les variations de conformation qui les régissent sont peu connues. Il est probable que la dimérisation des récepteurs ou bien le pré-couplage aux protéines G entraîne l'existence de nombreuses formes aux propriétés pharmacologiques différentes. Les antagonistes ne déclenchant pas la cascade de signalisation nous focaliserons par la suite sur l'action des agonistes.



La manière dont l'information est transmise par le récepteur de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule reste encore floue pour la majorité des RCPG (Gudermann, 1996). Un changement de conformation induit par la fixation de l'agoniste, et permettant la fixation des protéines G du côté intracellulaire, est supposé. Il a notamment été démontré une modification de l'inclinaison du sixième segment transmembranaire de la rhodopsine, après activation par la lumière. Lorsque ce déplacement est bloqué par la formation d'un pont disulfure, le récepteur n'est plus capable d'activer la protéine G (Farrens, 1996). De même, les hélices 3 et 6 du récepteur β_2 -adrénergique subissent un changement conformationnel après la fixation de l'agoniste (Gether, 1997). Citons encore Salamon qui a montré par résonance plasmonique de surface une augmentation d'épaisseur de la membrane après fixation de l'agoniste sur le récepteur delta opioïde. Cette augmentation (de l'ordre de 10%) serait le résultat d'un changement de conformation du récepteur, et n'est pas visible après liaison de l'antagoniste (Salamon, 2002).

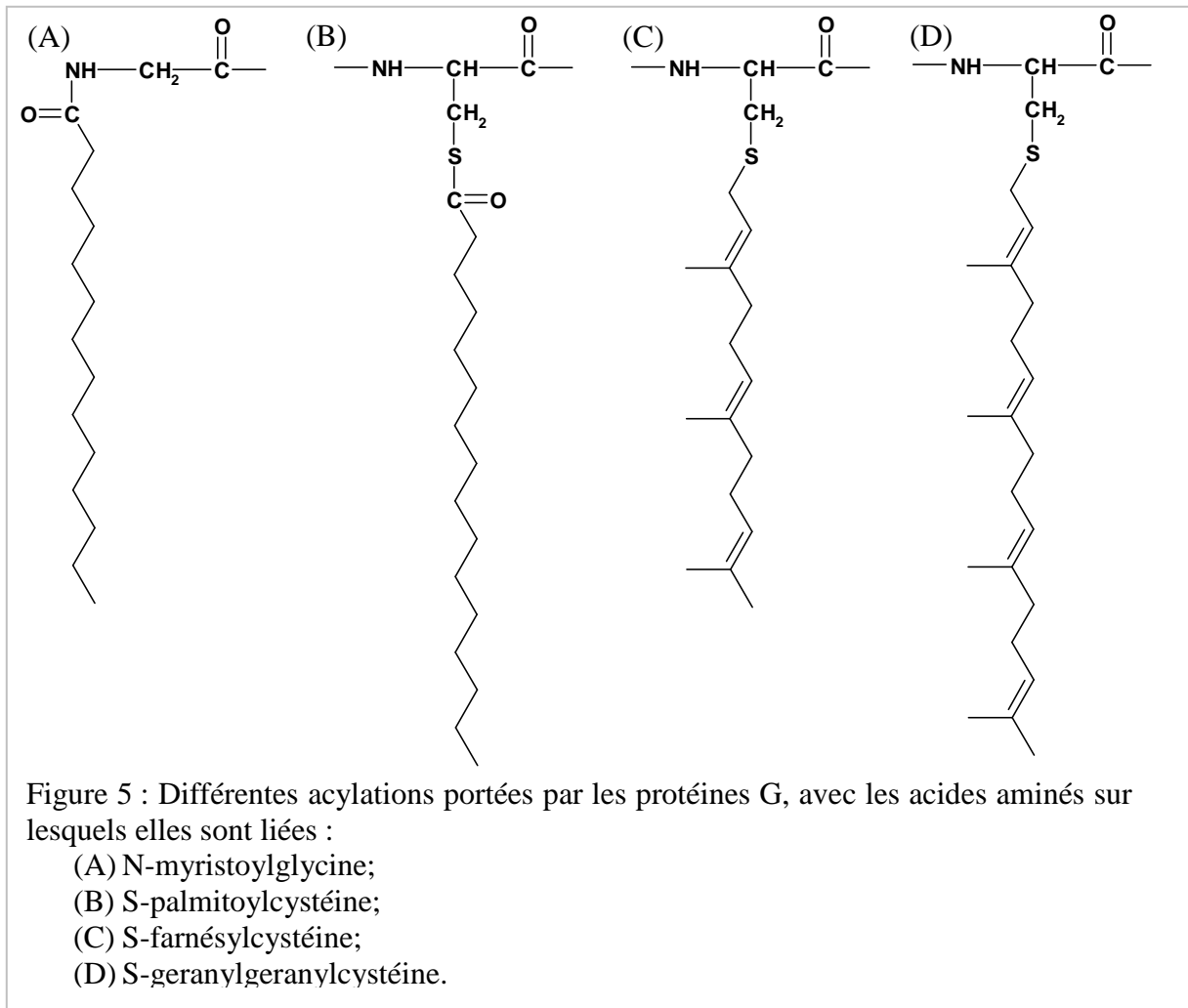
1.3.2 – Les protéines G

→ Le trimère

Les protéines G sont composées de 3 sous-unités. La sous-unité α porte le site de fixation GDP/GTP alors que les deux autres restent associées et sont appelées dimère $\beta\gamma$. La sous-unité α a longtemps été considérée comme la sous-unité active du trimère. Les protéines G sont donc classifiées en fonction de cette dernière en quatre grandes familles : les G_i , G_s , G_q , et G_{12} . La famille des G_i , qui comprend également les G_o et G_z , a été caractérisée comme inhibant l'adénylate cyclase (Carter, 1993 ; Matesic, 1991; Wong, 1992) ; cette dernière étant au contraire stimulée par la famille des G_s . Les G_q et G_{12} vont activer différentes phospholipases. Enfin la protéine G_t , ou transducine, est la protéine G spécifique à la rhodopsine.

Le dimère $\beta\gamma$ interagit également avec des effecteurs, en particulier l'adénylate cyclase ou des kinases (Cabrera-Vera, 2003 ; Gilman, 1987; Hur, 2002; Tang, 1991). A ce jour 23 sous-unités α , 5 β et 12 γ différentes sont connues. Les hétéro-trimères possibles sont donc particulièrement nombreux, bien qu'ils ne soient pas tous possibles (Cabrera-Vera, 2003). On peut également noter que la composition en chaque sous-unité varie d'un type cellulaire à l'autre (Cabrera-Vera, 2003; Gudermann, 1996; Matesic, 1991).

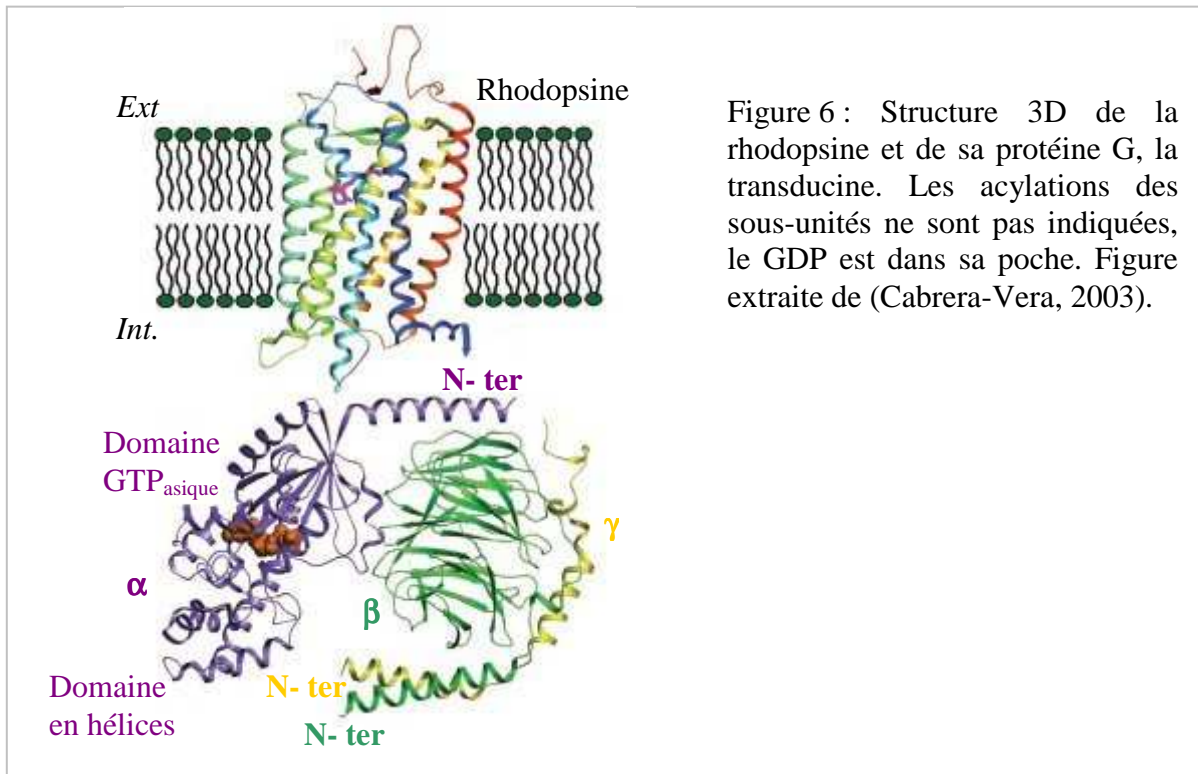
Les protéines G sont ancrées dans le feuillet interne de la membrane plasmique grâce à des acylations. La sous-unité α porte un myristate ou un palmitate au niveau N-terminal alors que la sous-unité γ est isoprénylée (par un farnésyl ou un géranylgeranyl, fig. 5). La sous-unité β ne porte pas de modification lipidique mais son association avec γ suffit à la maintenir à la membrane. Des différences d'acylation existent entre les familles de G_α ainsi les $G_{\alpha i}$ sont myristoylées et palmitoylées (Mumby, 1990), les deux ancres étant nécessaire à un bon adressage à la membrane. Les autres G_α sont palmitoylées, parfois en plusieurs sites (Cabrera-Vera, 2003 ; Dunphy, 1998). En plus du rôle d'ancre membranaire ces modifications lipidiques semblent intervenir dans la formation du trimère, ainsi la palmitoylation de $G_{\alpha s}$ favorise la liaison au dimère $\beta\gamma$ (Iiri, 1996).



→ Structure

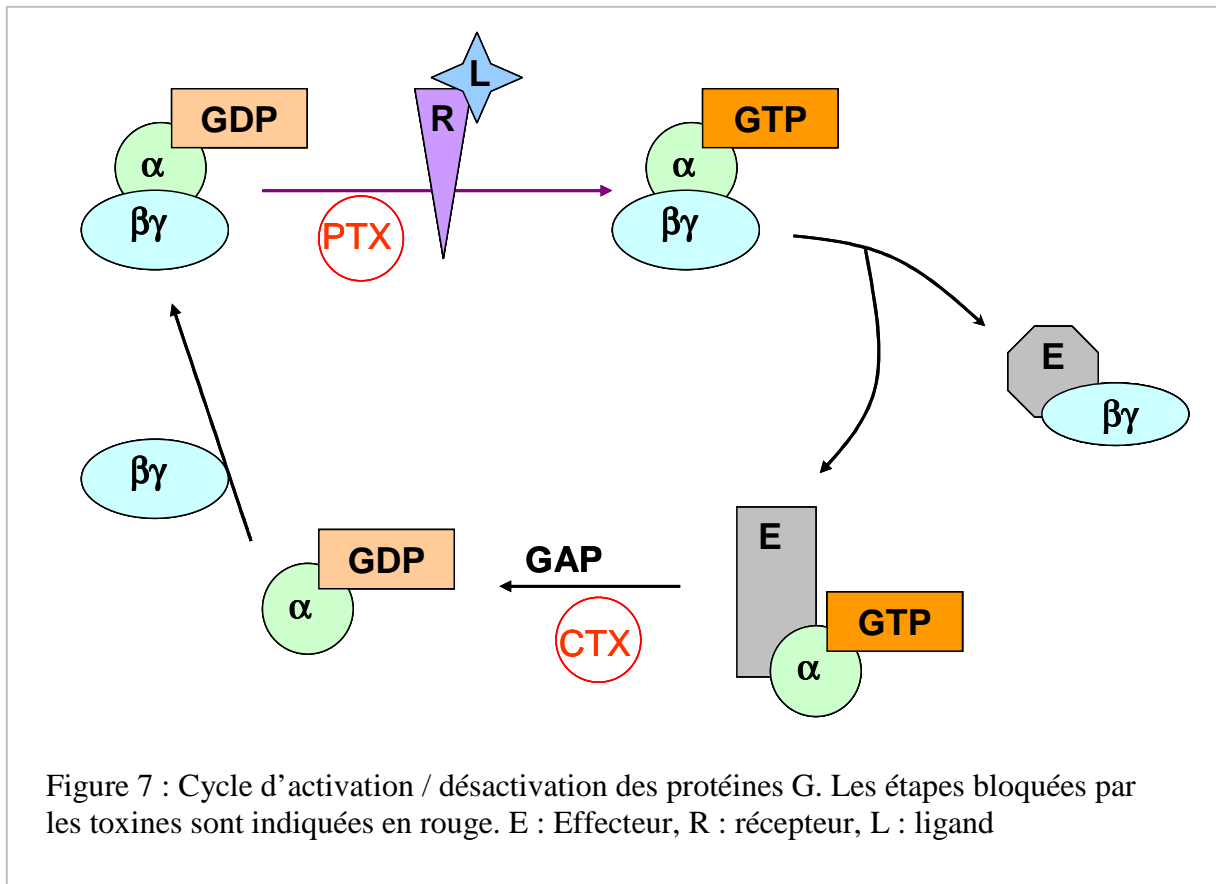
Les structures tridimensionnelles de plusieurs protéines G ont été déterminées, la première étant celle de la transducine, protéine G spécifique de la rhodopsine obtenue plus récemment à haute résolution (Palczewski, 2000). La sous-unité α est composée de deux parties : la première possède l'activité d'hydrolyse et la seconde, appelée *domaine en hélices*, permet de maintenir le GTP dans le cœur de la structure. L'extrémité C-terminale, trop désordonnée pour être résolue, n'est pas indiquée (fig. 6). L'extrémité N-terminale s'ordonne en hélice au contact de la sous-unité β . Cette dernière est structurée par 7 feuillets β et une hélice α en N-terminal qui permet l'association de la sous-unité γ . L'interaction $\alpha\beta\gamma$ est plus forte quand α est sous la forme GDP, l'échange par le GTP réduit l'affinité de α pour le dimère $\beta\gamma$ (Cabrera-Vera, 2003). On peut remarquer la taille de la protéine G hétéro-trimérique qui est aussi grande, voire plus, que le récepteur lui-même. Cette information est à

prendre en compte quand on envisage la liaison de plusieurs protéines G sur le même récepteur.



→ Cycle GDP / GTP

L'activité principale des protéines G est l'hydrolyse du GTP en GDP. Liées au GDP, elles sont sous forme trimérique inactive. La liaison de l'agoniste sur le récepteur entraîne leur activation, c'est-à-dire le remplacement du GDP par un GTP, grâce à des protéines d'échange (GEF). Le trimère est alors dissocié et chacune des deux parties va interagir avec ses effecteurs. L'hydrolyse du GTP en GDP (activée par la protéine GAP) sépare la sous-unité α de son effecteur et permet de recréer le trimère $\alpha\beta\gamma$. Il existe des toxines capables d'ADP-ribosyler certaines protéines G, ce qui les rend constitutivement actives (toxine cholérique, CTX) ou au contraire bloque leur activation (toxine pertussique, PTX ; fig. 7).



→ Pré-couplage avec le récepteur

La possibilité d'un pré-couplage entre la protéine G et le récepteur est régulièrement évoquée. En se basant sur les paramètres pharmacologiques obtenus, des travaux sur le récepteur α_2 -adrénergique ont conclu au pré-couplage d'environ un tiers de ces récepteurs avec sa protéine G (Neubig, 1988). Ce pré-couplage est diminué en présence des antagonistes, ou d'ions Na^+ (Tian, 1994). La recherche de telles associations a beaucoup progressé avec le développement des technologies de transfert d'énergie de fluorescence (FRET). Cette méthode a été utilisée sur le récepteur α_2 -adrénergique par deux équipes différentes qui ont obtenu des résultats contradictoires. Les premiers ne distinguent du FRET entre le récepteur et la protéine G qu'en présence d'agonistes, ce qui va à l'encontre d'un pré-couplage (Hein, 2005). Les seconds concluent au contraire à l'existence d'un pré-couplage formant des pentamères (dimère de récepteurs en liaison avec la protéine G hétérotrimérique) dans la membrane (Nobles, 2005). Un pré-couplage du récepteur β -adrénergique avec la protéine G hétérotrimérique a également été observé (Gales, 2005). De plus il ressort qu'après activation par l'agoniste, la protéine G ne se sépare pas du récepteur mais effectue plutôt une réorientation de ses trois sous-unités pour transmettre le signal (Gales, 2006).

1.3.3 – Les effecteurs

Le système de transduction par les protéines G est très efficace car il amplifie le signal initial. Cela est dû au fait que chaque sous-unité (α et $\beta\gamma$) déclenche une réponse, et qu'une même sous-unité peut activer plusieurs effecteurs. Enfin on peut supposer qu'un seul récepteur soit capable d'activer plusieurs protéines G à la suite. Le nombre d'isoformes de chaque partenaire, les possibilités de couplages et/ou de dimérisation des récepteurs, ainsi que les phénomènes de régulation qui interviennent, rendent ainsi compte d'un système très complexe (Gudermann, 1996). Les protéines dont la fonction est régulée par un RCPG (effecteurs) sont très nombreuses, les plus connues étant l'adénylate cyclase, les phospholipases ou les canaux ioniques (sodium, calcium, ...). On peut également évoquer des kinases (tyrosines, Ark, ...) ou bien les protéines Rho (Bockaert, 1998; Pierce, 2002). De plus ces effecteurs libèrent par la suite des messagers secondaires (AMP cyclique, inositol triphosphate, ...) qui induisent eux-mêmes d'autres effets, et peuvent également déclencher d'autres voies de signalisation. Il a par exemple été établi un lien vers la voie des MAP kinases par l'intermédiaire de la protéine kinase A (AMPc dépendante, (Gudermann, 1996)).

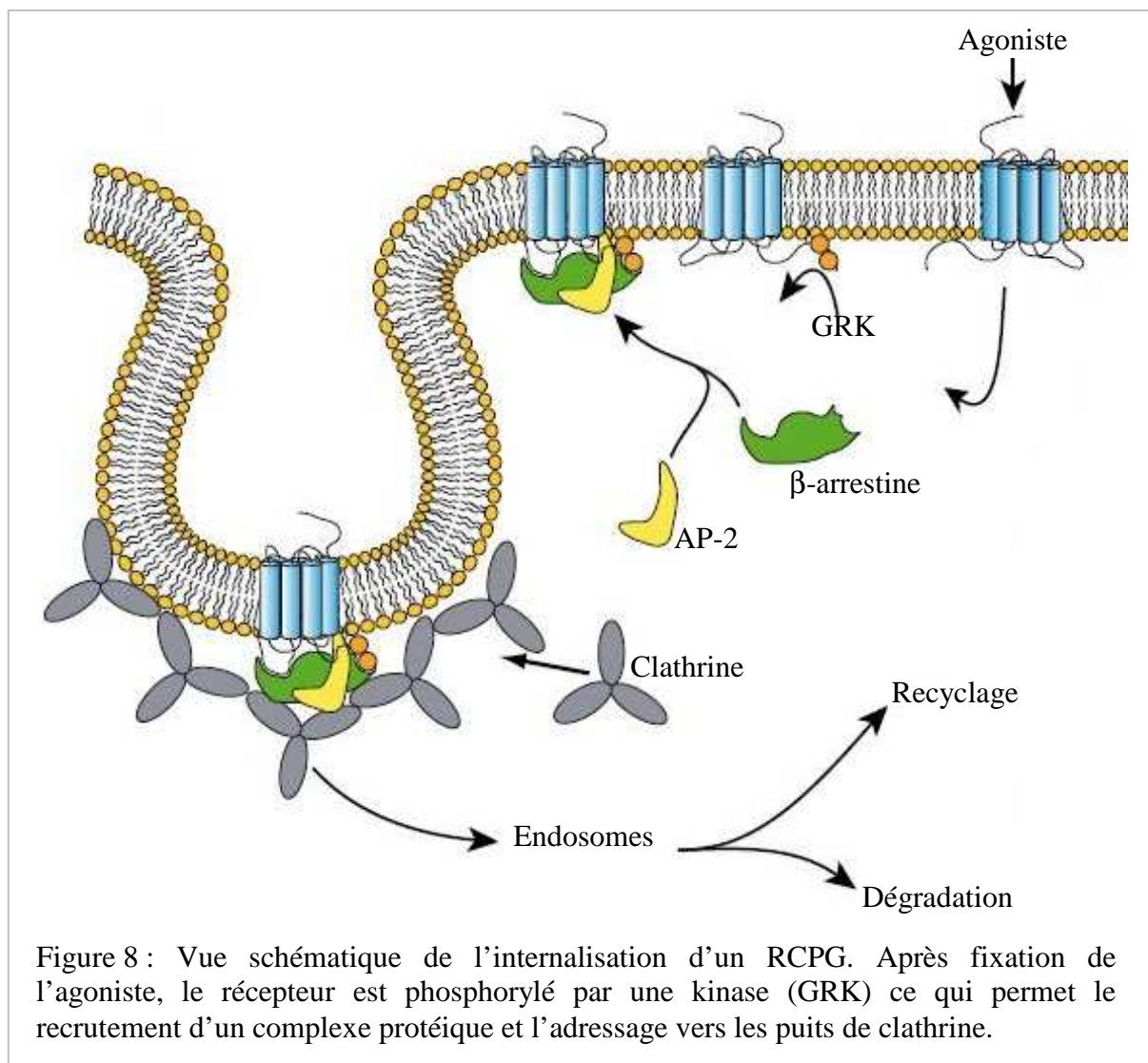
1.3.4 – Internalisation consécutive à la fixation de l'agoniste

En plus de la transduction du signal, la liaison de l'agoniste entraîne l'internalisation des récepteurs. Cette dernière se fait principalement par le biais des puits de clathrine, même si des exemples par les cavéoles ou d'autres structures membranaires (non identifiées) sont notifiées (Claing, 2002). Cette endocytose permet de désensibiliser la cellule, c'est-à-dire d'arrêter la réponse. Elle participe également à la régulation négative qui a lieu après les traitements chroniques avec certains agonistes. Ce phénomène induit une diminution à long terme du nombre de récepteurs, par dégradation de ces derniers ou modification de leur taux d'expression (Tsao, 2000 ; Yu, 2003).

La première étape du processus d'internalisation est la liaison de l'agoniste, mais l'étape primordiale semble être la phosphorylation consécutive du RCPG activé. Des kinases spécifiques des RCPG (GRK) reconnaissent cette forme active, et la phosphorylent au niveau des résidus « sérine » et « thréonine » de la boucle i3 et de l'extrémité C-terminale. Citons la GRK₂, spécifique notamment du récepteur β -adrénergique et du récepteur μ opioïde, dont la montée à la membrane est médiée par le dimère $\beta\gamma$ (Koch, 1993 ; Pitcher, 1998). D'autres

kinases moins spécifiques tels que PKA et PKC peuvent intervenir ou bien les tyrosines kinases, mais cette fois de manière indépendante des protéines G (Pak, 1999).

La phosphorylation du récepteur activé crée un site de haute affinité pour la liaison des β -arrestines ce qui permet d'une part d'empêcher tout nouveau recrutement de protéine G et d'autre part de recruter un complexe protéique (AP-2, clathrine, ... (Kirchhausen, 2000)) menant à l'endocytose par les puits de clathrine (Ferguson, 2001). Les récepteurs vont ensuite dans les endosomes où ils peuvent être soit dégradés (processus majoritaire lors de la régulation négative (Shenoy, 2001)), soit découplés de leurs ligands et ramenés à la membrane (fig. 8, arrêt de la réponse, (Pierce, 2002)).



L'internalisation des récepteurs activés est essentielle pour arrêter la transduction du signal. Elle nécessite la reconnaissance et l'interaction spécifique de nombreuses protéines avec le récepteur au niveau membranaire. La régulation des RCPG (nombre et état d'activation) est un processus finement régulé par la cellule, par des mécanismes qui ne sont pas encore très bien connus.

1.4 – Signalisation sans les protéines G

A leur découverte les RCPG ont été uniquement caractérisés par leurs facultés d'interaction avec les protéines G. De plus en plus de travaux mettent en évidence un passage de signal directement entre le récepteur et les effecteurs. Ainsi des motifs de liaison connus tels que les domaines PDZ ou poly-proline ont été retrouvés dans les séquences intracellulaires de certains récepteurs. Nombreuses sont les protéines qui sont ainsi capables d'interagir directement avec certains RCPG, notamment la famille des petites protéines G, ou bien la tubuline, des kinases, Homer, NHERF, etc. (Ferguson, 2001; Hall, 1999). Ces liaisons avec des protéines dites *d'échafaudage* entraînent également une réponse de la cellule. Le récepteur β -adrénergique transmet de la sorte son signal à ERK par une voie indépendante des protéines G (Shenoy, 2006). Ces voies constituent à ce jour un important axe de recherche pour appréhender toutes les implications des RCPG dans la transduction du signal.

Au sein des récepteurs couplés aux protéines G, l'équipe d'A. Lopez et de L. Salomé s'intéresse aux récepteurs aux opiacés. C'est sur un membre de cette famille, le récepteur μ opioïde humain (hMOR) que s'est effectué ce travail.

2 – Le récepteur μ dans la famille des récepteurs opioïdes

2.1 – Préambule

L'opium est utilisé depuis l'antiquité pour ses effets analgésiques ; mais son principe actif, la morphine, n'a été découvert qu'au début du XIX siècle. De nature alcaloïdique il s'agit du ligand exogène le plus connu, massivement utilisé comme analgésique en médecine. Néanmoins, la morphine entraîne tout comme ses dérivés (codéine, héroïne, étorphine) des effets secondaires négatifs : accoutumance, dépendance et tolérance qui diminue son efficacité à long terme. Ses mécanismes de fonctionnement ne sont pas encore complètement élucidés.

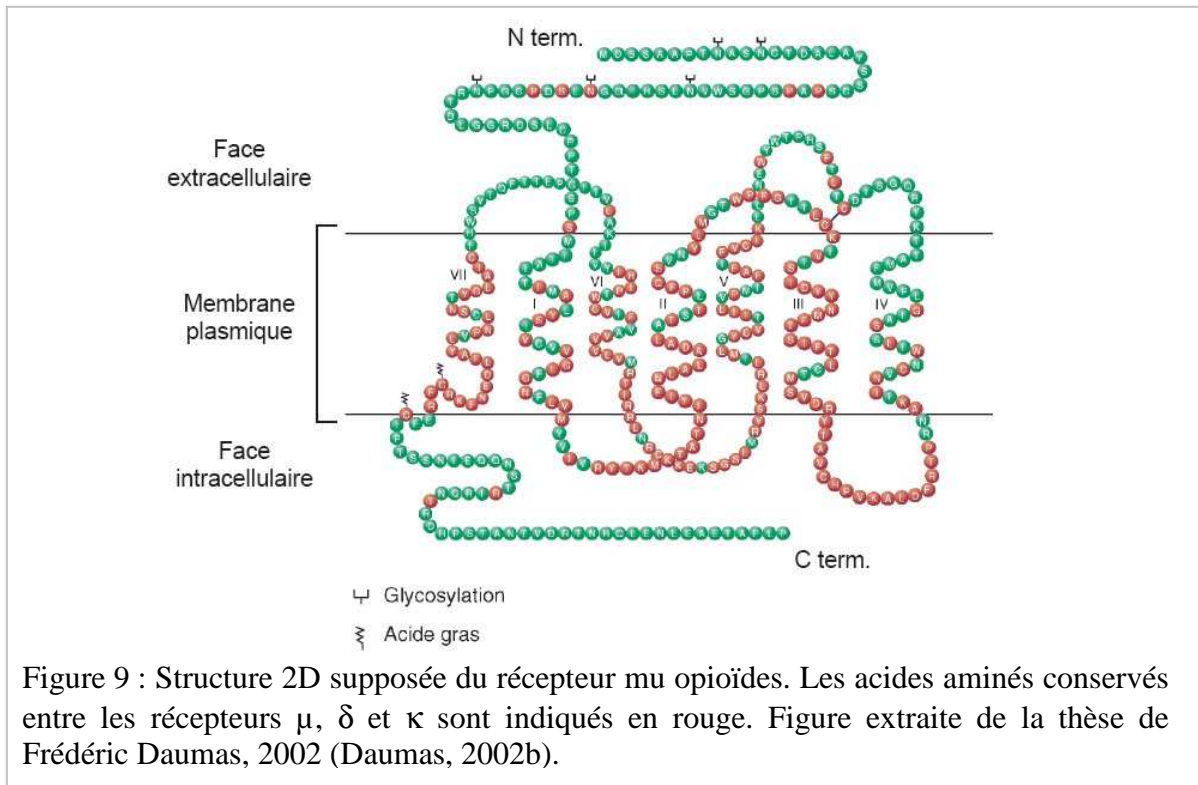
Dans les années 1970, les sites de liaison de la morphine et d'autres ligands opioïdes ont été découverts par des études pharmacologiques. La famille des récepteurs aux opiacés a été identifiée, et ses différents membres discriminés par la découverte de ligands spécifiques de chacun d'eux. Ces récepteurs sont principalement présents dans le système nerveux central et périphérique mais ont également été localisés dans des tissus périphériques (système digestif, ...). De nombreux ligands endogènes de nature peptidique (enképhalines, endorphines, endomorphine et dynorphines) ont été découverts à la même époque.

Dans les années 1990, le séquençage de ces récepteurs a permis de les classer dans la famille des récepteurs à 7 segments transmembranaires. Cela a également rendu possible leur clonage et leur analyse pharmacologique dans des systèmes hétérologues (Snyder, 2003; Stanasila, 1999). A ce jour, de nombreux ligands opioïdes, endogènes et exogènes, agonistes et antagonistes, de nature peptidique ou alcaloïdique sont connus et caractérisés (Janecka, 2004). Néanmoins la médecine est encore à la recherche d'un ligand spécifique, efficace contre la douleur et dépourvu d'effets secondaires.

2.2 – Les différents membres de la famille

2.2.1 – Mu, delta et kappa (μ , δ , κ)

Trois types de récepteurs opioïdes ont été découverts et caractérisés par l'utilisation de ligands spécifiques (Raynor, 1994). Le récepteur mu opioïde (MOR) tient son nom de la morphine dont il est le principal récepteur. Par extension, les autres récepteurs découverts ont été appelés delta (DOR) et kappa (KOR). Des sous-types de chaque récepteur ont été supposés à partir des différences pharmacologiques relevées dans différents systèmes d'études (Connor, 1999). Toutefois, la découverte ultérieure d'un seul gène codant par récepteur a permis de déterminer que la pharmacologie complexe de chacun est plus liée à des différences d'environnement qu'à l'existence de sous-types codés par des gènes différents. Il a néanmoins été trouvé des variants d'épissage qui peuvent influencer sur la fonctionnalité du récepteur. Les récepteurs MOR, DOR et KOR (μ , δ et κ) ont environ 60 % d'homologie de séquence, et présentent les caractéristiques de la famille 1a des RCPG. Leur homologie est encore plus marquée dans les séquences transmembranaires (75 %) et dans les boucles intracellulaires (86 à 100%). Les différences les plus importantes se situent au niveau des boucles extracellulaires et dans les extrémités C- et N- terminales (Law, 1999b). Elles sont probablement la cause des variations de propriétés de liaisons et d'effets des ligands entre les trois récepteurs (fig. 9).



2.2.2 – Le cas particulier d’ORL1

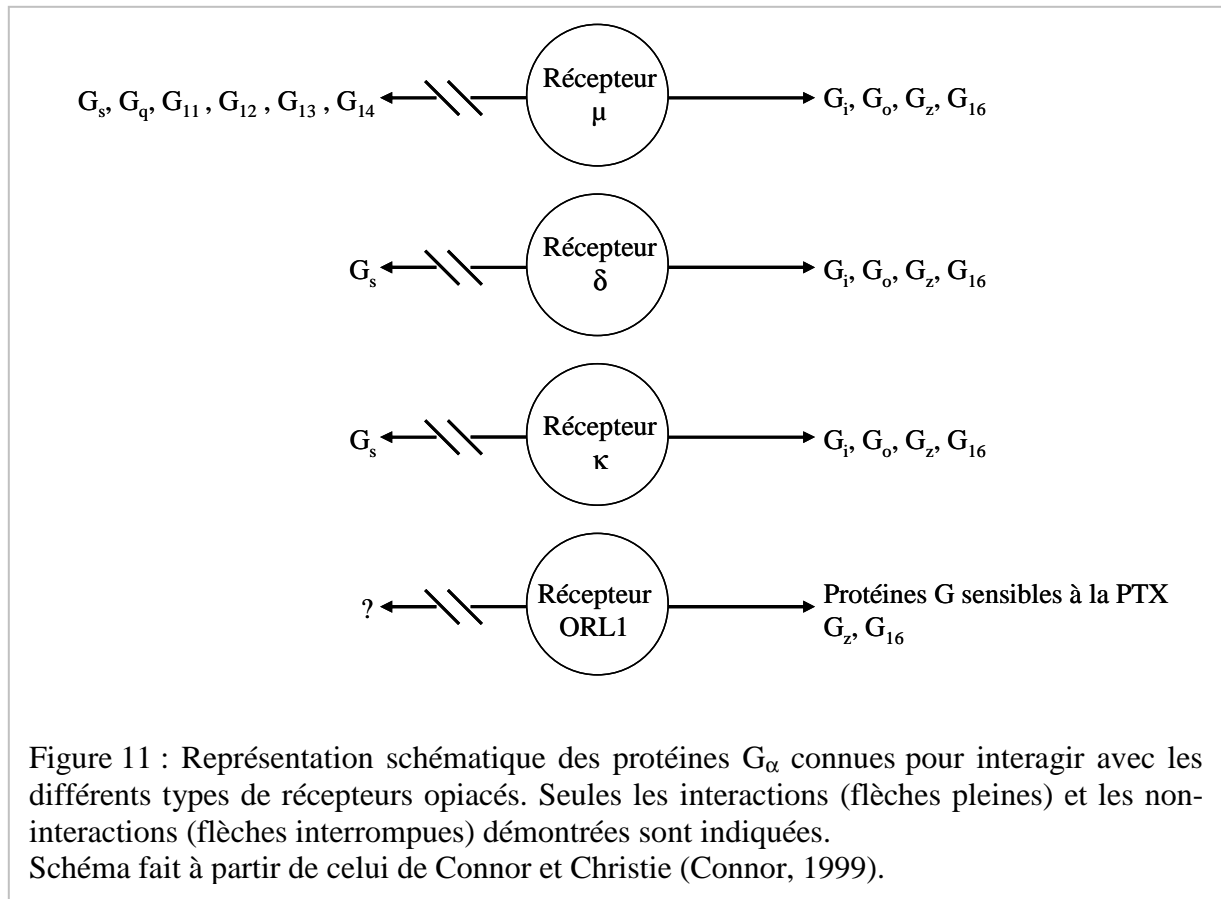
La connaissance des séquences de ces récepteurs a permis d’identifier un gène codant pour un RCPG possédant 60 % d’homologie. La comparaison des séquences avec différents RCPG a permis de supposer qu’il s’agissait d’un récepteur de type opioïde, capable de se lier aux protéines $G_{i/o}$. Après expression dans des cellules CHO, il s’est avéré capable de fixer un antagoniste opioïde « universel » (la diprénorphine), et également un agoniste opioïde « universel » (l’étorphine). Dans ce dernier cas, cette liaison entraîne une inhibition de l’adénylate cyclase. Cette inhibition ayant lieu à des concentrations trois fois plus importantes que pour les autres récepteurs opioïdes, et la liaison d’autres ligands opioïdes s’étant révélée peu spécifique, ce nouveau récepteur humain a été appelé ORL-1 pour *opioid like receptor* (Mollereau, 1994). La découverte de son peptide endogène, la nociceptine (Meunier, 1995; Reinscheid, 1995), a permis d’observer qu’en dépit de différences notables, il existait d’importantes similarités de structure et de fonction entre ORL-1 (et son ligand) et le trio de récepteurs opioïdes (et leurs ligands). Ce récepteur, renommé NOP (*Nociceptine OPIoïde*), est donc à présent un membre à part entière de la famille des récepteurs aux opiacés (Henderson, 1997) mais ne sera que peu évoqué par la suite par manque de données comparatives avec les autres membres de la famille.

MOR) au niveau des boucles extérieures 1 et 3 (Minami, 1995; Onogi, 1995; Wang, 1995). Des chimères formées avec le récepteur μ et celui à l'angiotensine impliquent également ces deux boucles dans la formation d'un site de liaison au DAMGO (Dietrich, 1998). Les effets de délétion des extrémités C- et N- terminales ont également été analysés et révèlent un rôle moindre dans les interactions avec les ligands et les protéines G que celui des boucles (Capeyrou, 1997; Dietrich, 1998; Wang, 1995). Par contre, l'extrémité C-terminale du récepteur δ intervient dans la down-régulation de ce récepteur (Cvejic, 1996). Des chimères, ainsi que des mutations ponctuelles, ont été réalisées pour chacun des récepteurs et permettent d'expliquer, au moins en partie, les différences de liaison et d'effets des ligands (Law, 2000), mais également les cas d'activité constitutive (Brillet, 2003).

2.4 – Les protéines G de liaison

Les lignées cellulaires de type neuronal, exprimant naturellement les récepteurs opioïdes, ont été particulièrement utilisées pour rechercher les protéines G impliquées dans la transduction du signal par ces récepteurs. Ainsi la lignée de neuroblastomes NG108-15, qui exprime de manière endogène le récepteur δ (mais ni μ ni κ) a permis de prouver que ce dernier se lie aux protéines de type $G_{\alpha i/o}$ (Kurose, 1983). La lignée SH-SY5Y dont nous parlerons dans le chapitre III a été largement utilisée pour caractériser les récepteurs μ et δ . L'expression des récepteurs dans des lignées où ils ne sont pas naturellement présents a également permis d'affiner la connaissance du rôle des protéines G impliquées. Ainsi il a été montré que le récepteur μ opioïde humain interagit avec de nombreux isoformes des protéines $G_{\alpha i}$ et $G_{\alpha o}$ (Gaibelet, 1999; Massotte, 2002) ainsi qu'avec $G_{\alpha z}$, mais pas avec $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12}$, $G_{\alpha 13}$ ni $G_{\alpha t}$ (Chan, 1995). La figure 11 résume les différentes protéines G capables d'être activées par les récepteurs opioïdes (Connor, 1999; Standifer, 1997).

Dans une même étude le récepteur κ , mais pas le récepteur μ , a été trouvé pré-couplé avec une protéine G (Frances, 1990). Un travail récent démontre au contraire un pré-couplage transitoire du récepteur μ opioïde murin (Lober, 2006). Ces résultats contradictoires indiquent que les interactions entre les différentes protéines G et les récepteurs aux opiacés ne sont pas encore comprises.



2.5 – Effecteurs opioïdes et traitement chronique

Après activation, les protéines G vont à leur tour transmettre l'information aux effecteurs, principalement l'adénylate cyclase (protéine membranaire qui convertit l'ATP en AMP cyclique) et des canaux ioniques (potassique et calcique). Comme pour les autres RCPG, il est probable que le dimère $G_{\beta\gamma}$ participe à la signalisation cellulaire. Enfin, en plus de leurs propriétés analgésiques, de nombreux autres effets de ces récepteurs sont suspectés en lien avec d'autres protéines membranaires (chimiokines) ou avec des voies de signalisation intracellulaire (voie des MAP kinase, Erk, ... (Tegeder, 2004)). Sans rentrer dans le détail de tous les effecteurs et voies de signalisation impliquées (Connor, 1999; Samways, 2006; Standifer, 1997), il est important de s'attarder un instant sur un des effets spécifiques des opioïdes qui est la tolérance et la dépendance aux opiacés.

La tolérance se définit comme une perte des effets des analgésiques aux doses habituellement actives. Quand à la dépendance, elle est caractérisée par le besoin de maintenir l'exposition à la drogue pour éviter les syndromes de manque, physique et psychique (Nestler, 1992). Ces phénomènes sont induits par une prise chronique des dérivés de l'opium (morphine, héroïne, ...) et non (ou peu) par les ligands endogènes. Au niveau cellulaire ils

correspondent à une régulation négative du système (*down-régulation*) qui peut avoir lieu à chaque niveau de la transmission du signal : nombre de récepteurs membranaires et/ou d'effecteurs plus faible, fixation moindre des ligands, ... (Bailey, 2005 ; Law, 1999a ; Yu, 2003). Ainsi, un traitement chronique à la morphine de cellules surexprimant le récepteur μ montre une modification des protéines exprimées à la membrane (Mouledous, 2005) mais également au niveau de la cellule entière (Neasta, 2006). Ces mécanismes restent à ce jour mal connus.

2.6 – Système de signalisation sans les protéines G

Bien que les récepteurs opioïdes transmettent principalement le signal par l'intermédiaire des protéines G, l'on est tenté de supposer que des interactions directes puissent avoir lieu entre le récepteur et un effecteur ou d'autres protéines régulatrices. Peu de résultats existent dans ce sens, mais on peut noter l'existence d'une liaison directe entre la queue C- terminale du récepteur KOP et la protéine NHERF après fixation d'un agoniste spécifique (Li, 2002). De même, d'autres travaux ont mis en évidence la modulation des canaux ioniques de manière indépendante des protéines G par les récepteurs NOP et μ (Abdulla, 1997; Twitchell, 1994).

2.7 – Dimérisation

2.7.1 – Au sein de la famille

Après la découverte de RCPG capable de former des dimères, de nombreuses études ont cherché à déterminer l'existence d'homo- et d'hétéro-dimères entre les trois principaux récepteurs opioïdes, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 1. A l'exception de l'hétérodimère μ/κ , toutes les autres combinaisons ont été trouvées. De plus, des structures plus importantes comme des oligomères sont parfois identifiées (George, 2000). La majorité de ces études ont été réalisées par co-immunoprécipitation puis analyse par Western Blot, à partir de récepteurs étiquetés ; néanmoins il faut noter que les systèmes d'expression varient (cellules d'insectes, HEK, ...) ainsi que la nature des récepteurs (murine ou humaine). Des études par complémentation fonctionnelle de deux récepteurs mutés ont également été réalisées (Pascal, 2005) ainsi que par transfert d'énergie de résonance utilisant comme donneur une molécule bioluminescente (Ramsay, 2002).

Les hétérodimères présentent généralement un profil pharmacologique différent des deux récepteurs qui le composent (Gomes, 2000), ce qui pourrait être à l'origine des sous-

types pharmacologiques de μ , δ et κ (Martin, 2001). Les cinétiques d'internalisation peuvent également être perturbées entre un récepteur exprimé seul ou en co-expression (Jordan, 1999).

	μ	δ	κ
μ	Li-Wei et al. 2002 Pascal and Milligan 2005	George et al. 2000 Gomes et al. 2000 Martin and Prather 2001 Law et al. 2005 Snook et al. 2006	Jordan and Devi 1999
δ		Cvejic and Devi 1997 McVey et al. 2001 Pascal and Milligan 2005	Jordan and Devi 1999 Ramsay et al. 2002
κ			Jordan and Devi 1999 Ramsay et al. 2002 Pascal and Milligan 2005

Tableau 1 : Résumé bibliographique des résultats obtenus pour la recherche d'homo- et hétéro- dimères dans la famille des récepteurs opioïdes. La case grisée correspond à un résultat négatif (absence de dimère trouvé).

Dans ces études, l'origine des dimères a été recherchée, et aucune ne conclue à une dimérisation par *domain swapping*. Dans certains cas une dimérisation grâce à la formation de pont disulfure est suspectée (Jordan, 1999) ; dans d'autres il s'agirait d'une dimérisation par contact (Snook, 2006). Dans certains cas il semblerait que la boucle i3 ou la queue C-terminale joue un rôle (Cvejic, 1997; Law, 2005). Une question importante reste de connaître le rôle fonctionnel de tels dimères.

2.7.2 – Avec d'autres récepteurs

L'existence d'hétéro-dimères entre les récepteurs opioïdes et non opioïdes a également été observée, par exemple entre le récepteur β_2 -adrénergique et δ ou κ , ou bien entre le récepteur au NPPF et μ (McVey, 2001; Ramsay, 2002; Rios, 2001; Roumy, 2007). Chaque hétéro-dimère a des propriétés différentes : ainsi l'hétéro-dimérisation du récepteur μ avec le récepteur α -adrénergique ne modifie ni les propriétés fonctionnelles, ni l'internalisation spécifique de chaque récepteur (Zhang, 2004). Au contraire l'hétéro-dimérisation du récepteur μ avec le récepteur aux chimiokines CCR5 entraîne une désensibilisation croisée : l'activation d'un des récepteurs limite l'interaction du second avec les protéines G et donc sa

signalisation. Néanmoins, seul le récepteur activé par son agoniste spécifique est internalisé (Chen, 2004).

En plus de la formation de dimères, deux RCPG peuvent également interagir par *cross-talk*, c'est-à-dire par une interaction entre les deux voies de signalisation de manière à renforcer les signaux ou au contraire à les atténuer. Ainsi la pré-incubation des cellules exprimant à la fois le récepteur NPFF₂ (transfecté) et les récepteurs μ et δ opioïdes (endogènes) avec l'agoniste du premier récepteur diminue les effets de l'activation des seconds. Ces résultats démontrent un effet anti-opioïde du récepteur NPFF₂, effet non réciproque car la signalisation du récepteur NPFF₂ n'est pas modifiée par l'activation préalable des récepteurs opioïdes (Mollereau, 2005). Un tel dialogue est également décrit entre les récepteurs aux chimiokines et les récepteurs aux opiacés. Les ligands opioïdes régulent l'activité des récepteurs aux chimiokines, et réciproquement, ce qui permet à la cellule de gérer les réponses neuronale et immune dans le même temps (Zhang, 2005).

A cause de leur implication dans les phénomènes d'analgésie et de l'importance médicale que cela sous-entend, les récepteurs opioïdes sont beaucoup étudiés (Chaturvedi, 2000). Les différences de séquence entre les types de récepteurs ne permettent pas de comprendre tous les profils pharmacologiques rencontrés. Il a été montré que la composition en protéines partenaires, à chaque niveau de la transmission du signal (autres récepteurs, GRK, effecteurs, protéines d'échafaudage, ...), peut moduler les propriétés de liaison des ligands, mais également la transmission du signal et le trafic des récepteurs.

La rencontre des différentes protéines partenaires au niveau de la membrane constitue un autre niveau de régulation. Afin de mieux comprendre ces étapes membranaires de transduction du signal il est donc essentiel de prendre en compte l'environnement du récepteur, c'est-à-dire la membrane plasmique et les molécules qui la composent.

3 - La membrane plasmique

3.1 – Découverte de la membrane

3.1.1 – Ses constituants

La bicouche membranaire est formée par les lipides. Sous ce terme générique se cache en réalité une grande diversité de constituants qui ont en commun leur nature amphiphile. Dans un premier temps on peut reconnaître plusieurs familles en fonction de leur structure : les sphingolipides, les glycérolipides et les stérols. Les premiers dérivent de la sphingosine et

les seconds du glycérol. Pour chacun, deux sous-groupes se différencient par le groupement porté en position 3, respectivement un sucre (sphingoglycolipides et glycéroglycolipides) ou un groupement phosphate (sphingophospholipide et glycérophospholipides).

La sphingomyéline, qui est un sphingophospholipide avec une choline comme tête polaire, est le seul sphingolipide présent chez les mammifères. Les glycérophospholipides sont les composés majoritaires des membranes plasmiques. Ils peuvent porter différentes têtes polaires (fig. 12) et des acides gras plus ou moins longs et insaturés.

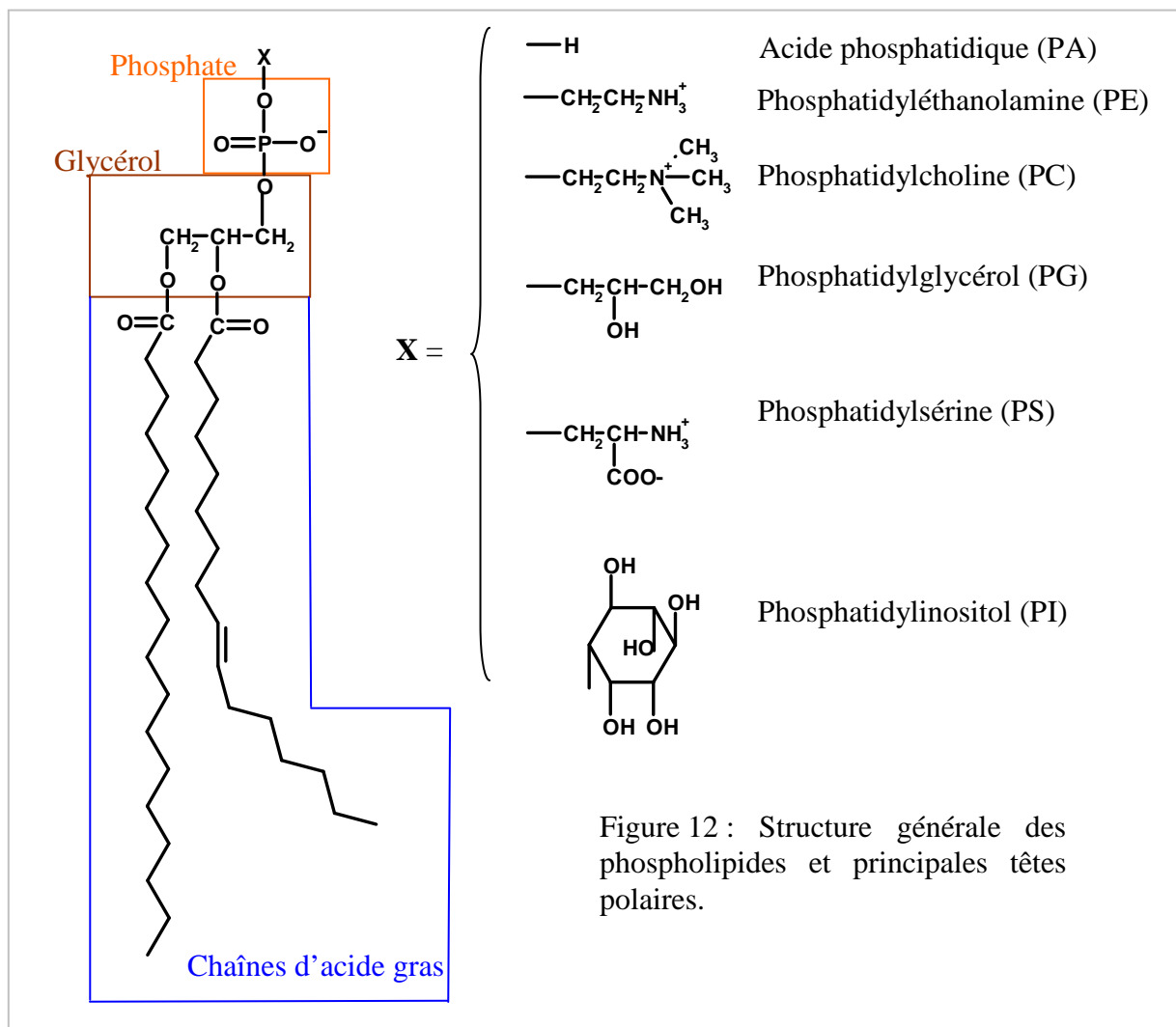


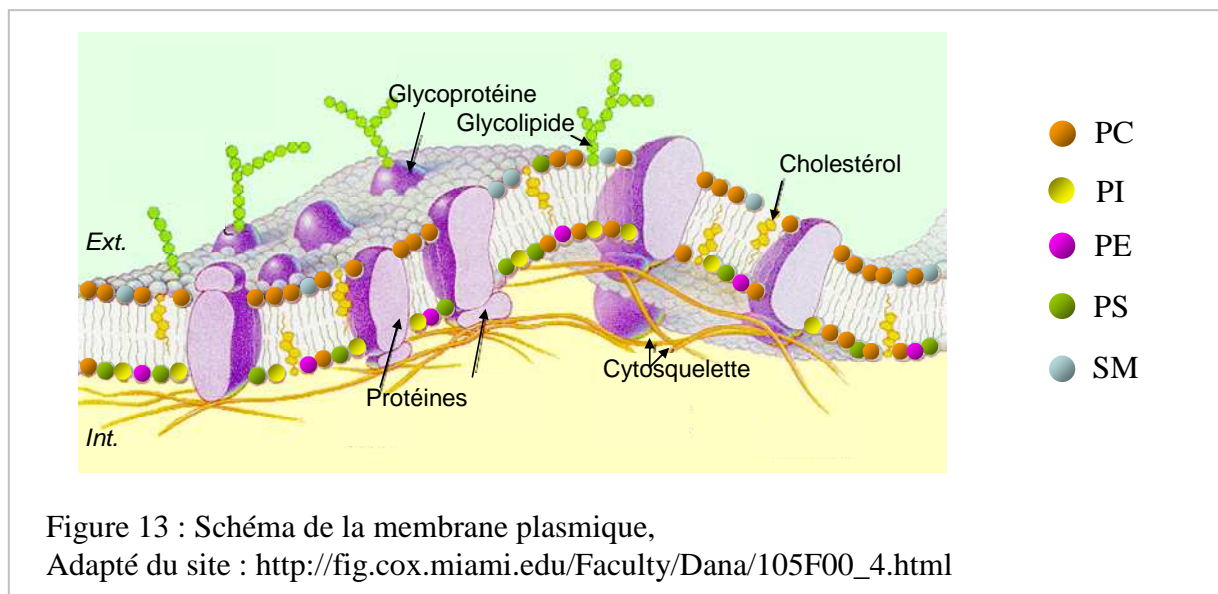
Figure 12 : Structure générale des phospholipides et principales têtes polaires.

Les lipides ne sont pas distribués de manière homogène entre les deux feuillets de la membrane : la PA est très minoritaire, les PS, PE et PI sont principalement situés dans le feuillet interne, les SM et les PC, majoritaires, sont quand à eux présents sur les deux feuillets, mais en proportion plus importante sur le feuillet externe (fig. 13, (Brand, 2001; Shechter, 2004)).

Au sein du groupe des stérols, le cholestérol est celui présent dans les membranes des cellules eucaryotes supérieures. En proportion, il représente le lipide majoritaire des membranes (environ 30% molaire). De plus il tient un rôle important dans la structure de la bicouche puisque son cœur stéroïde induit une certaine rigidification de cette dernière. Il possède un petit groupement polaire qui lui permet de s'orienter. Par ailleurs il est au centre de l'hypothèse des *rafts* que nous verrons dans le §3.2.1.

Dans les constituants de la membrane, il ne faut pas oublier les protéines qui représentent environ 60 % de la surface. Elles peuvent être classées en deux groupes en fonction de leur imbrication dans la bicouche : les protéines transmembranaires qui traversent la membrane et les protéines périphériques. Ces dernières sont insérées dans un seul des deux feuillettes ou bien en interaction avec la membrane via des ancres lipidiques, des interactions électrostatiques ou des protéines. Les protéines peuvent également être classées en fonction de leur rôle biologique (cf. §3.1.2).

Les sucres sont très minoritaires dans la membrane plasmique. Ils ont néanmoins une importance car beaucoup de composants membranaires sont glycosylés au niveau de leur partie extracellulaire, et constituent ainsi une barrière plus ou moins dense au dessus de la bicouche. Enfin on peut noter la présence d'un élément sous-membranaire dont nous parlerons par la suite : le cytosquelette (fig. 13).



3.1.2 – Ses rôles

Les premiers rôles de la membrane sont liés à sa position à l'interface du milieu extérieur : elle constitue une protection pour la cellule et permet également les échanges avec l'extérieur. La plupart des fonctions qui lui sont attribuées sont effectuées par les protéines, et sont trop nombreuses pour être toutes énumérées. Citons toutefois les protéines d'échanges (transporteurs membranaires, canaux ioniques), celles assurant l'adhésion entre les cellules ou sur une surface, celles possédant une activité enzymatique (protéases et lipases) ou bien toutes celles qui participent à la réception et à la transmission des informations extérieures (dont les RCPG).

Les lipides ont d'abord été considérés comme servant uniquement de matrice aux protéines, mais on sait aujourd'hui qu'ils ont un rôle plus important. Ainsi la présence sur le feuillet externe de phosphatidylserine entraîne la reconnaissance de la cellule par les macrophages (Maulik, 1998) Certains lipides particuliers, tel que le phosphatidylinositol-diphosphate (PIP₂), sont également des messagers secondaires et permettent la transmission d'informations (McLaughlin, 2005).

3.1.3 – Les premiers modèles d'organisation membranaire

Dès la découverte de l'existence d'une membrane entourant les cellules, vers la fin du XIXe siècle, plusieurs modèles d'organisation membranaire ont été proposés prenant en compte la composition connue (ou supposée) en lipides et en protéines. Citons notamment Charles Overton qui détermina les lipides comme étant la composante majoritaire des membranes en 1895. En 1925, Gorter et Grendel ont imaginé une structure en bicouche des lipides, mais qui ne considérait pas l'existence de protéines. Dix ans plus tard Danielli et Davson rajoutaient de chaque côté de cette bicouche une épaisseur de protéines, établie alors comme le second constituant des membranes. Dans les années 1950, la microscopie électronique a permis de visualiser la membrane plasmique. L'épaisseur (environ 6 nm) ainsi que l'aspect des membranes observées (deux couches foncées entourant un centre plus clair) semblaient cohérents avec la proposition de Danielli et Davson et ont assuré la pérennité de ce modèle jusqu'à la fin des années 1960.

En 1970, la technique de cryofracture appliquée à différents types de membranes (Bayer, 1970; Wrigglesworth, 1970) met en évidence la présence de protéines enchâssées, et commence à mettre à mal ce modèle. La même année, Frye et Edidin démontrent la diffusion des constituants membranaires et ajoutent ainsi la notion de dynamique des composants de la membrane (Frye, 1970). En se basant sur ces travaux, Singer et Nicolson présentent un

nouveau modèle de membrane dite *en mosaïque fluide* (Singer, 1972). Dans ce modèle, les protéines sont supposées se déplacer sans contrainte dans le plan de la bicouche lipidique. Dans le même temps, ils classifient ces dernières en fonction de leur hydrophobicité et de leur ancrage dans la bicouche, séparant les protéines périphériques de celles transmembranaires. Ce modèle est la base des modèles membranaires modernes.

3.2 – Complexification des modèles membranaires : notions de domaines

Le nombre de constituants membranaires différents, ainsi que les interactions spécifiques nécessaires au bon fonctionnement de nombreuses protéines, ont laissé supposer qu'une organisation plus complexe que ne le présume le modèle de mosaïque fluide pouvait exister dans la membrane. L'existence de zones particulières dans lesquelles les lipides et les protéines resteraient de manière préférentielle a été supposée. L'origine, la nature et le rôle de ces domaines sont au cœur de nombreux débats.

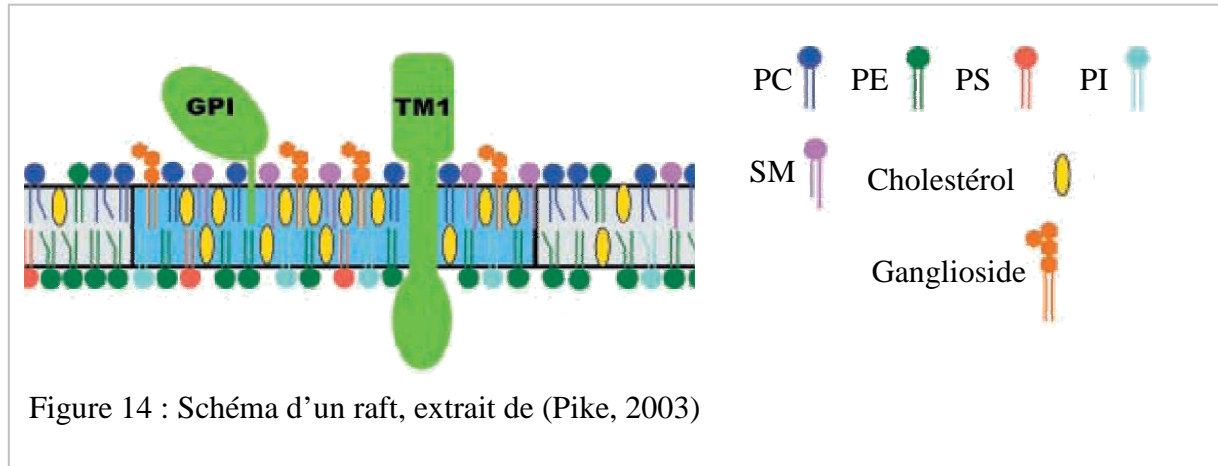
3.2.1 – DRM ou raft

→ Découverte

Simons et Ikonen émettent en 1997 l'hypothèse de la formation dans les membranes de domaines particuliers appelés rafts ou *DRM* (Simons, 1997). Ils sont caractérisés par leur mode d'obtention et leur composition. Le nom de *Detergent Resistant Membrane* provient de leur résistance à la solubilisation par le détergent. Ils sont séparés du reste de la membrane solubilisée, par un gradient de saccharose sur lequel ils « flottent », d'où leur second nom de radeau lipidique (*raft*). L'analyse de leur composition a révélé un pourcentage plus élevé de cholestérol et de sphingomyéline que dans le reste de la membrane (fig. 14). Cette composition est caractéristique de la phase liquide ordonné (Lo), phase plus structurée et plus épaisse que la phase fluide (ou désordonnée, Ld) du reste de la membrane (Brown, 2002; London, 2002). De nombreuses études ont été menées sur des systèmes modèles afin de déterminer les conditions de formation de cette phase particulière. Le cholestérol s'est avéré essentiel pour éviter la formation de phases gels et induire les phases liquides ordonnées. Ainsi, dans des *GUV*, la sphingomyéline s'associe spontanément avec ce dernier pour former des domaines excluant le *DOPC* (Baumgart, 2003).

L'analyse des rafts obtenus après extraction au détergent des membranes a permis de définir en plus de la composition lipidique des protéines dites *marqueurs de rafts*, en

particulier la phosphatase alcaline, les protéines à ancre GPI ou la cavéoline (fig. 14). Cette dernière est le composant principal des cavéoles, structures participant à l'endocytose et incluses dans la famille des rafts (Brown, 1998).



→ Problèmes soulevés

Bien que des études sur des systèmes modèles aient permis de déterminer que l'extraction au détergent ne crée ni ne détruit de phase L_0 (Brown, 1998; London, 2002) la méthodologie d'obtention des rafts, indirecte et surtout invasive pour la cellule, soulève des questions. Ainsi différents protocoles existent en fonction de la nature du détergent utilisé, ou bien en absence de détergent (Smart, 1995); et il est apparu que la composition des DRM obtenus variait avec le procédé d'extraction choisi (Mayor, 1995; Schuck, 2003; Taylor, 2002). De même, la méthode utilisée pour l'analyse des rafts sur cellules *in situ*, c'est-à-dire la déplétion en cholestérol, soulève des interrogations. En effet, le cholestérol est impliqué dans de nombreux processus et il est difficile de relier directement les effets de la déplétion avec les domaines rafts (Kwik, 2003; van Rheenen, 2005). De plus cette technique ne permet pas d'extraire la totalité du cholestérol, ce qui rajoute à la difficulté d'interprétation des résultats.

La présence de ces domaines sur l'un ou l'autre des feuillettes de la membrane reste également une question en suspens. L'hypothèse majeure serait une synergie des deux feuillettes, par l'intermédiaire de protéines transmembranaires (non déterminée) ou du cholestérol (Pike, 2003; Rietveld, 1998). Cette hypothèse a été récemment validée par la formation de domaines sur les deux feuillettes après induction sur le seul feuillet externe (Chen, 2006b). Le rôle physiologique de ces domaines reste également non résolu. Un grand nombre de protéines, dont les protéines G et certains RCPG, y a été trouvé, amenant la question du

rôle des rafts dans leur fonctionnalité et dans la transduction du signal (Pike, 2003 ; Rietveld, 1998 ; Simons, 2000).

Relier les domaines obtenus après solubilisation de la membrane avec ceux présents dans la membrane plasmique de cellule vivante reste malaisé. De plus la taille supposée des rafts ne permet pas une visualisation directe sur cellules et il est dès lors difficile de corrélérer ces domaines, connus uniquement par leur composition, avec des domaines observés sur cellules vivantes par des méthodes dynamiques. Une définition des rafts a finalement été établie en 2006 au *Symposium on lipid rafts and cell function* : “*Membrane rafts are small (10-200 nm), heterogeneous, highly dynamic, sterol- and sphingolipid-enriched domains that compartmentalize cellular processes. Small rafts can sometimes be stabilized to form larger platforms through protein-protein and protein-lipid interactions.*” (Pike, 2006). Cette définition, relativement large et imprécise, reflète les incertitudes qui entourent la notion de rafts à l’heure actuelle, les preuves de leur existence étant aussi nombreuses que celles ne la confortant pas (Jacobson, 1999).

→ Rafts et dynamique

Ces domaines ont également été recherchés sur cellules in-situ, par des techniques de biophysique (décrites dans le chapitre II) non-invasives pour les cellules. La diffusion et l’organisation de molécules marqueurs de rafts (protéine à ancre GPI et GM1) ont été analysées par suivi de particule unique. Près du tiers de ces deux molécules présente un confinement temporaire dans des domaines de l’ordre de 200 à 350 nm de diamètre, pendant des durées inférieures à 10 secondes. Les résultats obtenus après déplétion en cholestérol des cellules (domaines plus petits, temps de résidence moins longs) vont dans le sens de l’existence de domaines rafts dans les cellules (Dietrich, 2002; Sheets, 1997). Une autre étude a été effectuée par FRAP sur l’hémagglutinine (HA), cette dernière étant retrouvée dans les zones rafts, ou non-rafts, en fonction des mutations qu’elle porte. Les coefficients de diffusion des protéines rafts (sauvages, ou fusionnées avec une ancre GPI) sont plus faibles que ceux des protéines mutées *non-rafts* (Shvartsman, 2003). Lors de cette étude, et d’une autre s’intéressant à des protéines différentes, la déplétion en cholestérol entraîne une augmentation du coefficient de diffusion des protéines rafts, qui devient dès lors équivalent à celui des protéines non-rafts (Pralle, 2000 ; Shvartsman, 2003). Les protéines rafts typiques que sont Thy1 et GM1 ont également été étudiées par FCS à *waist* variable et révèlent une organisation en domaines, qui n’est plus présente après des traitements enzymatiques modifiant le

cholestérol ou la sphingomyéline. Dans ce cas le coefficient de diffusion des protéines est plus lent lorsqu'elles ne sont plus dans les domaines. Il est possible que cela soit lié à une différence de la composition membranaire due aux traitements enzymatiques utilisés (Lenne, 2006).

Un consensus semble donc se dégager sur les protéines dites *marqueurs de rafts*. En effet, ces protéines retrouvées dans les fractions non-solubilisées par le détergent sont présentes, dans les membranes de cellules *in-situ*, dans des domaines et ont des coefficients de diffusion influencés par la présence du cholestérol. Nous allons voir que les études portant sur les lipides rafts ou non rafts sont moins unanimes.

Ainsi la comparaison du comportement diffusionnel de deux lipides : l'un marqueur de rafts (saturé), et l'autre non (insaturé) a également été effectuée par SPT. Le premier a une diffusion confinée dans des grands domaines (600 à 700 nm) alors que le second n'a pas de limite à sa diffusion. Cette organisation membranaire différente est interprétée par les auteurs comme la preuve de rafts présents dans la membrane des cellules (Schutz, 2000). La diffusion de trois lipides a été observée par FCS à *waist* variable : deux avec la fluorescéine insérée dans une des chaînes grasses (la sphingomyéline et un lipide PC) et le troisième qui a des chaînes saturées en C₁₆ et le groupement fluorescent sur la tête polaire (PE). Seule la sphingomyéline présente une diffusion en accord avec l'hypothèse rafts, les deux autres lipides n'étant ni présents dans des domaines, ni sensibles à la modulation de la teneur en cholestérol (Lenne, 2006).

Les deux lipides rafts testés dans ces études ont des structures proches (di-C_{14:0} et di-C_{16:0} ; marqués sur la tête polaire PE) ; il semble donc que la notion de lipides rafts et non-rafts soit plus complexe que dans le cas des protéines. Ces différents résultats démontrent néanmoins l'importance du cholestérol dans la diffusion de certains des constituants membranaires. D'autres causes sont également supposées participer au confinement observé, tel que le cytosquelette cortical.

3.2.2 – De l'influence du cytosquelette cortical

Le cytosquelette d'actine est une structure très proche de la membrane, reliée à elle grâce à des *ancres*. Son rôle principal consiste à rigidifier la membrane, et donc à conserver la forme de la cellule. Il a également été suspecté dans la compartimentation des constituants membranaires. Les implications du cytosquelette vis-à-vis de l'organisation membranaire peuvent être regroupées en trois catégories : d'une part une stabilisation des domaines

lipidiques membranaires préexistants, d'autre part une compartimentation des constituants de la membrane, enfin une interaction directe avec certains composants.

Dans le premier cas il a été montré en système modèle (GUV) que la présence d'un réseau d'actine, formé à partir de PIP₂, stabilise les domaines en phase Lo. De plus ce réseau entraîne un déplacement de la température de transition de phase. Ainsi les phases Lo se forment à une température plus élevée en présence du réseau d'actine (Liu, 2006). Le rôle de PIP₂ avait déjà été mis en évidence comme un lien entre les rafts et le cytosquelette, la présence de PIP₂ favorisant la polymérisation de l'actine à partir des plates-formes *rafts* (Ikonen, 2001; Rodgers, 2001; Rozelle, 2000).

Le second cas correspond au *membrane skeleton model* établi par Akihiro Kusumi, qui postule que le cytosquelette constitue un obstacle à la diffusion des protéines membranaires (Kusumi, 1993). Ces dernières seraient gênées dans leurs déplacements par les filaments d'actine qui délimiteraient ainsi des domaines. Ce modèle a été établi à partir des travaux sur le récepteur à la transferrine qui présente, en suivi de particule unique, une diffusion confinée dans des domaines de tailles cohérentes avec la maille du cytosquelette cortical (Kusumi, 1993). La diffusion à longue distance observée sur le même système, en FRAP, serait due au passage des protéines par *sauts* d'un domaine à l'autre (Kusumi, 1996; Kusumi, 1993). Des délétions de la partie cytoplasmique des protéines du CMH de classe I ont également permis de démontrer l'influence de barrières placées à 2-3 nm sous la membrane sur la diffusion de ces protéines (Edidin, 1994). Par la suite, la diffusion de lipides (DOPE) s'est également révélée compartimentée de manière double : domaines de 230 nm inclus dans d'autres de 750 nm de diamètre. Les petits domaines observés augmentent de taille lorsque la cellule est soumise à une drogue déstabilisant le cytosquelette (Fujiwara, 2002). Pourtant les lipides ne sont pas en contact avec ce dernier puisqu'ils sont insérés dans le feuillet externe de la membrane. Le modèle a donc été modifié en *anchored membrane-protein picket model* qui prend en compte les ancrages du cytosquelette, ces derniers gênant la diffusion des constituants sur les deux feuillets de la membrane (fig.15 ; (Fujiwara, 2002)). Les molécules bloquées dans les mailles d'actine profitent des déplacements et des mouvements des piquets et des filaments d'actine pour passer d'un domaine à l'autre (sauts, (Kusumi, 2005)).

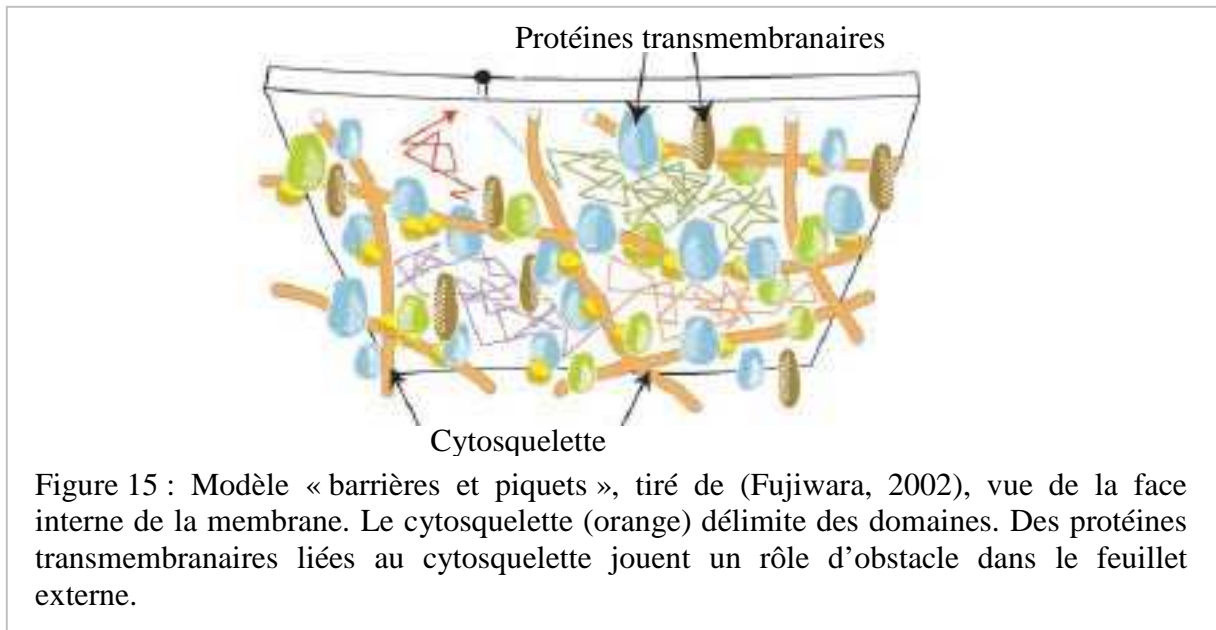


Figure 15 : Modèle « barrières et piquets », tiré de (Fujiwara, 2002), vue de la face interne de la membrane. Le cytosquelette (orange) délimite des domaines. Des protéines transmembranaires liées au cytosquelette jouent un rôle d'obstacle dans le feuillet externe.

Il existe de nombreuses drogues qui permettent de déstabiliser le cytosquelette, ou, au contraire de le figer. Elles sont largement utilisées dans la recherche des confinements dus aux filaments d'actine (ou aux microtubules). Le récepteur à la transferrine a été suivi par une autre technique (FCS) qui a également révélé une compartimentation. Elle est accentuée quand le cytosquelette est renforcé, au contraire elle est fortement réduite quand les filaments d'actine sont dépolymérisés. Nous reviendrons sur l'origine du confinement de ce récepteur par la suite. L'étude du même lipide (DOPE) par cette technique n'a pas permis de distinguer une diffusion confinée de ce dernier (Lenne, 2006).

La diffusion de certaines protéines semble donc effectivement modulée par le réseau d'actine, mais les effets sur la diffusion des lipides ne semblent pas concordants.

Enfin, certaines molécules présentent un type de diffusion particulier appelé *diffusion dirigée*, qui se caractérise par le déplacement de la molécule dans une direction privilégiée. Ce mode de diffusion est supposé être dû à la liaison de la molécule suivie avec le cytosquelette (Jacobson, 1995). Cette hypothèse a été prouvée pour certaines protéines dont le lien avec le cytosquelette était préalablement connu d'un point de vue fonctionnel (Schmidt, 1993) ou sans lien connu *a priori* (Sergé, 2003). Néanmoins il n'est probablement pas justifié d'attribuer toutes les diffusions dirigées observées à une interaction avec le cytosquelette d'actine.

A ce jour il semble improbable que le cytosquelette n'ait aucune influence sur la diffusion des constituants membranaires. Sa proximité et son interaction avec la membrane, par le biais des ancres, font de lui un candidat parfait pour la compartimentation des constituants membranaires. Néanmoins, à l'exception des protéines connues pour leur lien avec les filaments d'actine, la question du rôle fonctionnel d'une telle organisation se pose encore.

3.2.3 – Interactions entre protéines

→ Interactions directes

En plus des deux modèles d'organisation membranaire déjà décrits, chaque protéine peut être influencée par des interactions directes avec d'autres protéines, en lien avec sa fonction. C'est notamment le cas du canal CFTR (régulateur de conductance transmembranaire de la fibrose kystique) qui possède à son extrémité intracellulaire un site de liaison lui permettant de lier une protéine adaptatrice EBP50 (*ezrin binding protein*). Analysées par différentes techniques, ces canaux se révèlent majoritairement liés à EBP50 et immobiles à la surface des cellules. L'addition de 10 histidines à la fin de la séquence permet de masquer le site de liaison, empêchant ainsi la fixation de la protéine adaptatrice, ce qui a pour conséquence de diminuer le nombre de CFTR immobiles, et d'augmenter le coefficient de diffusion. Dans le même temps, la diffusion du CFTR muté présente des zones de confinements transitoires, qui pourraient s'apparenter aux domaines rafts (Bates, 2006). Citons encore le cas du récepteur à la glycine dont la diffusion est modifiée par la géphyrine. Lorsque cette protéine est liée au récepteur ce dernier présente une alternance entre une diffusion aléatoire rapide et une diffusion confinée plus lente (d'un facteur 10), cette dernière étant corrélée à la formation d'agrégats de géphyrine. Lorsque le site de liaison n'est plus présent, le récepteur présente majoritairement (80%) une diffusion rapide et aléatoire (Meier, 2001).

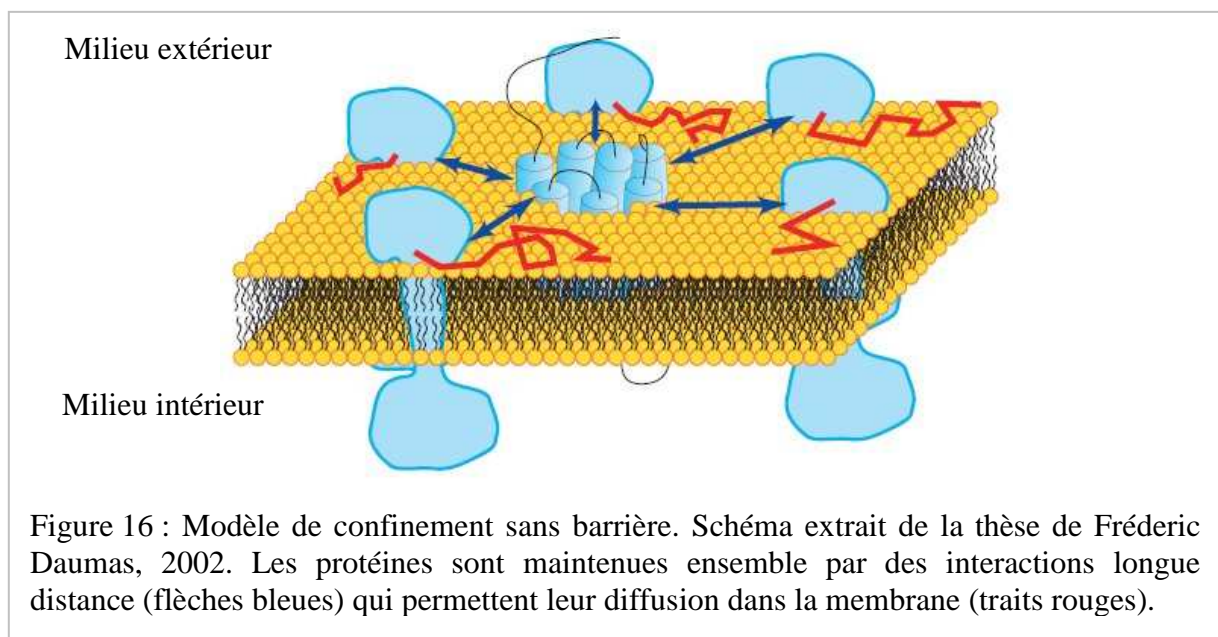
Les protéines adaptatrices, aussi appelées protéines d'échafaudages, sont donc essentielles pour la fonction mais aussi pour l'organisation et la diffusion de multiples protéines. L'analyse de la diffusion d'une protéine membranaire nécessite de prendre en compte les interactions spécifiques qu'elle peut former.

→ Interactions à longue distance

Le dernier type de domaines que nous allons aborder a été proposé dans notre équipe

sur la base de travaux antérieurs. Ce modèle de *particules browniennes en interaction*, ou *agrégats dynamiques*, postule que des interactions attractives à longue distance entre les protéines membranaires seraient la source de certains confinements observés. Il permet de rendre compte de certains confinements non expliqués par les interactions avec le cytosquelette. Ce modèle prend en compte la grande densité de protéines présentes dans une membrane plasmique, notion importante déjà mentionnée par Abney et Scalettar (Abney, 1989). Une protéine possède ainsi une diffusion propre confinée au sein de l'ensemble et une diffusion à longue distance à travers la diffusion du domaine (fig. 16).

Les résultats obtenus sur la diffusion du récepteur mu opioïde humain ne concordaient pas avec le modèle des barrières de cytosquelette. Ce récepteur présente effectivement une diffusion confinée dans des domaines, mais peu de sauts entre domaines ont été détectés. De plus la variation du coefficient de diffusion avec le carré de la taille des domaines n'est pas cohérente avec un modèle de barrières (Daumas, 2003a, b).



Un autre modèle se basant sur quelques hypothèses simples a donc été mis en place (Daumas, 2003b). Dans un premier temps il postule que les protéines se déplacent à longue distance de manière aléatoire dans la membrane. A plus faible distance la diffusion d'une protéine est influencée par la proximité spatiale d'une autre, ce qui modifie les coefficients de diffusion. Si l'interaction est de nature attractive, alors les protéines tendent à rester confinées dans une région ayant pour centre le centre de masse des différentes protéines ($\langle X_c \rangle$). Dans

ce cas le centre de masse possède une diffusion Brownienne dépendante du nombre de protéines (N_p) qui interagissent :

$$\langle X_c^2 \rangle = \frac{4D_{micro}}{N_p} t = 4D_{macro} t \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Soit :} \quad D_{macro} = \frac{D_{micro}}{N_p} \quad (\text{Eq. 2})$$

En supposant que la concentration en protéines est suffisamment importante pour considérer que le coefficient de diffusion soit principalement influencé par les interactions protéine-protéine, alors :

$$D_{micro} \approx \frac{1}{\rho} \quad (\text{Eq. 3})$$

Où ρ est la concentration en protéines, c'est-à-dire le nombre de protéines (N_p) dans un domaine de surface L^2 :

$$\rho = \frac{N_p}{L^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Dans ce cas, si le nombre de protéines reste constant malgré la variation de taille de domaines alors on retrouve :

$$D_{micro} \approx L^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

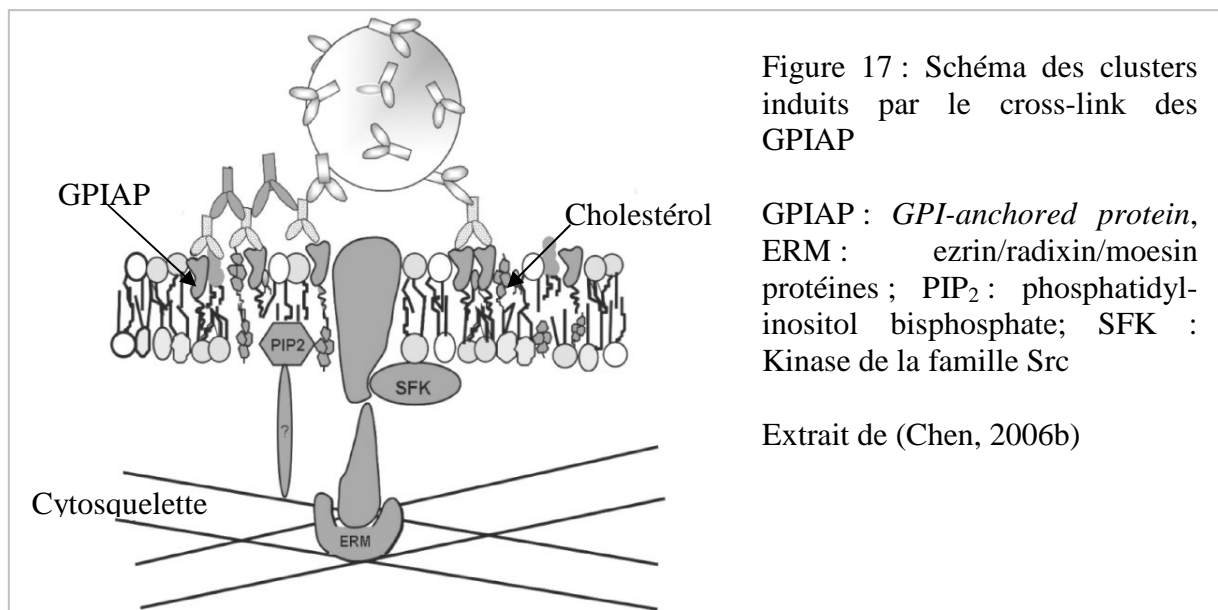
Ce modèle à l'avantage d'expliquer de façon simple les résultats qui ne concordent pas avec d'autres modèles (cytosquelette ou rafts). De plus l'analyse des paramètres obtenus suffit à le valider, ce qui ne nécessite pas de perturber la cellule.

3.3 – La mosaïque membranaire ...

Bien que l'organisation précise de la membrane plasmique reste à ce jour mal connue, des consensus se dégagent. Il est à présent acquis que le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson est une vision trop simple pour rendre compte de la complexité de la membrane (Engelman, 2005). La présence de micro-domaines est également admise par la communauté scientifique (Vereb, 2003). Toutefois, la nature, l'origine, ainsi que le rôle fonctionnel de ces derniers restent à définir. La taille et la durée de vie de ces micro-domaines sont également variables en fonction des systèmes et des molécules observées (Edidin, 2001; Engelman, 2005; Lagerholm, 2005; Marguet, 2006).

Chacun des modèles pris séparément ne permet pas d'expliquer tous les résultats présentés dans la littérature. Il est parfois nécessaire d'envisager un effet coopératif pour expliquer les résultats obtenus. Ainsi un double effet cytosquelette-raft est proposé par Jacobson en 1999, parmi les différents modèles de micro-domaines rafts (Jacobson, 1999). Des résultats obtenus pour NrCAM (protéine permettant l'adhésion cellulaire) montrent effectivement un lien entre sa présence dans les zones rafts, son couplage spécifique avec d'autres protéines via des sites de liaison, et enfin l'interaction avec le cytosquelette. De ce fait la destruction des rafts diminue le nombre de NrCAM capable de se lier au cytosquelette (Falk, 2004).

La création volontaire de clusters de protéines à ancre GPI (GPIAP pour *GPI anchored protein*) par *cross-linking* a également révélé des influences multiples. Le cluster présente une diffusion aléatoire entrecoupée par des périodes d'immobilisation. Lorsque la SFK (Src Family kinase) est inhibée, ou dans le cas d'une déplétion en cholestérol, la diffusion du cluster redevient aléatoire. Ainsi il apparaît que les GPIAP, situées dans le feuillet externe, sont liées de manière transitoire au cytosquelette par l'intermédiaire d'une protéine transmembranaire, elle-même piégée dans le cluster créé (fig. 17). Ce lien avec le cytosquelette est dépendant du cholestérol, mais également d'une kinase de la famille Src (Chen, 2006b).



Les premiers résultats obtenus pour la diffusion du récepteur à la transferrine ont permis d'établir le modèle d'organisation membranaire par les barrières du cytosquelette (Kusumi, 1993). Ce résultat a été confirmé par une autre étude, qui a également révélé que ce récepteur était soumis à l'influence additionnelle de domaines de types rafts (Lenne, 2006). Ainsi seul l'effet conjoint de la diminution de la teneur en cholestérol de la membrane et de la déstructuration du cytosquelette permettent à la diffusion du récepteur à la transferrine de redevenir aléatoire. Enfin, dans la même membrane, d'autres molécules ne sont sensibles qu'à une origine de confinement. Ainsi l'organisation de la sphingomyéline et une protéine à ancre GPI, molécules typiques des rafts, est sensible à la diminution du taux de cholestérol seul entraînant leur diffusion aléatoire (Lenne, 2006).

Pour finir, certaines protéines présentent des diffusions liées à des domaines particuliers tels que les cavéoles ou les synapses. Plusieurs protéines synaptiques ont été étudiées en SPT par l'équipe de D. Choquet (Choquet, 2003) notamment le récepteur à la glycine et des récepteurs au glutamate (mGluR5 et AMPA/mGluR2). L'influence des protéines adaptatrices est prépondérante ainsi que la liaison au cytosquelette qu'elles entraînent. De plus, il a été montré que les influx calciques jouaient un rôle sur la diffusion d'AMPA. Pour chaque protéine étudiée le passage dans les domaines synaptiques entraîne une diminution du coefficient de diffusion, et ce confinement apparaît réversible (Borgdorff, 2002; Sergé, 2002). L'existence de tels domaines au niveau des synapses nous permet de garder en mémoire l'intérêt fonctionnel de la compartimentation de certaines protéines.

La transduction du signal, fonction principale des RCPG, nécessite la rencontre de plusieurs partenaires au niveau de la membrane ; c'est à ce titre que ces récepteurs représentent de bons candidats pour la question de l'organisation membranaire.

4 – Organisation membranaire des RCPG

4 1 – Premiers modèles de rencontre des partenaires

La nécessité de rencontre des différents partenaires (récepteurs, protéines G et effecteurs) au niveau de la membrane fait des RCPG un modèle de choix pour l'étude de l'organisation et de la dynamique membranaire, en relation avec une fonction biologique. Les premières analyses, réalisées par des techniques pharmacologiques, cherchaient à déterminer les paramètres cinétiques qui régissent les interactions entre le récepteur et l'effecteur. C'est à partir de ces valeurs qu'ont été établies les premières hypothèses de pré-couplage : récepteur /

effecteur ; récepteur / protéine G ; protéine G / effecteur ou récepteur / protéine G / effecteur ou de rencontre des partenaires à la membrane (De Lean, 1980; Tolkovsky, 1982). En application du modèle de mosaïque fluide décrit par Singer et Nicolson la diffusion des différentes protéines était considérée libre. La vision qui a fini par prévaloir est celle où la protéine G en se déplaçant sur la face interne de la bicouche sert d'intermédiaire entre le récepteur et l'effecteur. Néanmoins, un tel système qui s'appuie sur la rencontre aléatoire des partenaires, ne permet pas de comprendre l'efficacité et la spécificité de la transduction du signal par les RCPG (Neubig, 1994).

Une conception intermédiaire a donc été proposée qui suppose une organisation du récepteur, des protéines G et des effecteurs dans des domaines appelés *plates-formes de signalisation* (Chidiac, 1998). Dans ce cas la proximité spatiale des trois partenaires permet d'expliquer l'efficacité du système, mais également la spécificité de signalisation des récepteurs. En effet des protéines qui ne doivent pas interagir peuvent être séparées dans des zones différentes de la membrane. Néanmoins ce modèle caractérise les domaines uniquement par leur fonction, et ne détermine pas la cause du confinement (rafts, cytosquelette, interactions protéiques, ...). Nous allons ici aborder les différents résultats obtenus sur les RCPG en dynamique, qui ont déterminé l'existence, ou non, de confinements. Nous verrons également les origines proposées pour les confinements trouvés.

4 2 – Analyse de la diffusion des RCPG

Les résultats présentés dans cette partie ont fait l'objet d'une publication sous la forme d'une mini-revue (Saulière A., Baker A., 2007 ; cf. annexe).

4.2.1 – A l'état basal

Tous les RCPG dont la dynamique a été analysée à ce jour se sont révélés compartimentés dans la membrane, à l'état basal. A part cette constante, des différences notables sont observées : au niveau de la taille des domaines, de la proportion de récepteurs confinés et de la durée de ce confinement. Ainsi environ 35 % des récepteurs NK2 exprimés dans des HEK293 sont confinés dans des domaines de 420 ± 80 nm de rayon ; les 65% restants diffusant à longue distance (Cézanne, 2004). Au contraire, dans ce même type cellulaire, 100% des récepteurs CCR5 ont une diffusion limitée dans des zones beaucoup plus grandes, de l'ordre de 1,5 μ m de rayon (Baker, 2007). Citons encore les récepteurs hMOR exprimés dans des NRK dont 90% sont dans des domaines d'un rayon moyen de 150 nm (Daumas, 2003a). Les récepteurs sont parfois confinés dans deux types de domaines différents

(double compartimentation) au sein de la même membrane. Ainsi une étude contradictoire sur le récepteur mu opioïde, toujours dans les NRK, a trouvé, en plus des domaines d'une centaine de nm de rayon, une seconde compartimentation dans des domaines trois fois plus grands (Suzuki, 2005). De même le récepteur odorant OR17-40 présente dans les HEK293 un confinement dit « faible » (rayon~350 nm) et un confinement dit « fort » (rayon~150 nm) (Jacquier, 2006). Enfin la durée du confinement des récepteurs est également variable : il est parfois confiné durant toute la durée de l'observation (Daumas, 2003a) ou bien alterne entre une diffusion aléatoire et une diffusion confinée, tel le récepteur au glutamate mGluR5 (Sergé, 2002).

Les coefficients de diffusion (D) moyens obtenus sont généralement de l'ordre de 10^{-2} $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Néanmoins ils sont difficilement comparables car le type cellulaire, ainsi que la technique peuvent l'influencer. De plus la taille des confinements dans lesquels se déplacent les récepteurs est un facteur qui peut faire varier le coefficient de diffusion. Une variation du D selon le carré de la taille des domaines est parfois observée, dont nous discuterons l'interprétation dans le paragraphe suivant. De même les différences obtenues au niveau des tailles de domaines sont à relativiser eu égard aux techniques différentes utilisées ainsi qu'aux systèmes cellulaires.

Certains RCPG présentent également une diffusion de type dirigé, c'est-à-dire allant dans une direction privilégiée, c'est le cas de près de 20 % du récepteur mGluR5 dans les cônes de croissances neuronaux. Afin d'étudier ce type de diffusion de manière spécifique, ce récepteur a été surexprimé dans des fibroblastes et sa diffusion observée dans leurs lamellipodes, zones possédant un cytosquelette particulièrement actif. Dans ces derniers 85 % des récepteurs suivent une diffusion dirigée, avec un coefficient de diffusion de 10^{-3} $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (Sergé, 2003).

4.2.2 – Origine des diffusions observées

Lorsque le récepteur est organisé en domaines dans la membrane, l'origine des confinements est recherchée. Aucun des trois modèles cités précédemment (cf. §3.2) ne permet d'expliquer l'ensemble des confinements de RCPG observés. Un exemple de chaque type va donc être donné.

L'analyse dynamique du récepteur LH ayant révélé sa présence dans des domaines de 230 nm de diamètre, une extraction des membranes au détergent a été effectuée et a révélé la présence du récepteur dans les DRM, laissant supposer que les domaines observés en

dynamique sont des rafts (Smith, 2006).

Une légère augmentation de la taille des domaines dans lesquels diffuse le récepteur mu opioïde (de 210 à 320 nm de diamètre) après destruction partielle du cytosquelette, permet aux auteurs de postuler que ces domaines sont limités par le réseau d'actine (Suzuki, 2005).

Le récepteur mGluR5, exprimé dans des cellules neuronales, a une diffusion qui alterne entre des périodes de confinement et des périodes de diffusion aléatoire. Ces zones de confinement correspondent aux zones où la protéine Homer, protéine d'échafaudage de mGluR5, forme des clusters. Ceci permet aux auteurs de conclure que la protéine d'échafaudage Homer régule la présence des récepteurs dans certaines zones de la membrane (Sergé, 2002).

Le modèle d'interaction à longue distance entre protéines a été mis au point à partir des données de l'équipe sur le récepteur hMOR (Daumas, 2003b). En effet, le coefficient de diffusion de ce récepteur varie en fonction du carré de la taille des domaines. Cette variation est le critère principal qui caractérise ce modèle. A partir des données trouvées dans la littérature on peut supposer que d'autres RCPG sont soumis à de telles interactions puisqu'ils présentent aussi un tel comportement, comme le récepteur odorant OR17-40 (Jacquier, 2006) ou bien le récepteur LH (Smith, 2006).

L'origine de la diffusion dirigée de certaines molécules est rarement recherchée. Citons néanmoins le récepteur mGluR5 dont la diffusion rétrograde dans les lamellipodes de fibroblastes est expliquée par les filaments d'actine, mais aussi par les microtubules (Sergé, 2003).

Comme pour toutes les protéines membranaires, il est probable que les RCPG subissent plusieurs types d'influences et d'interactions, et donc que l'origine de leur confinement soit multiple. L'exemple du récepteur mGluR5, qui a des types de diffusion différents en fonction des cellules dans lesquelles il est exprimé met en exergue l'importance de la fonction du récepteur sur son type de diffusion (dans ce cas la protéine Homer (Sergé, 2002)), mais également l'influence du type cellulaire (ici l'existence d'un cytosquelette très actif dans les lamellipodes (Sergé, 2003)).

4.2.3 – Effets des ligands

Après l'analyse de l'organisation membranaire du récepteur à l'état basal, les études se sont portées sur l'effet de la liaison des ligands sur la diffusion du récepteur. Les antagonistes, parce qu'ils n'entraînent pas de réponse cellulaire, sont généralement peu étudiés. Quand c'est le cas, les résultats sont contradictoires. Certains récepteurs ne voient pas leur diffusion modifiée. C'est le cas du récepteur 5HT-1 dont ni le coefficient de diffusion, ni la proportion de récepteurs diffusant à longue distance, ne varient (Pucadyil, 2004). Au contraire, dans le cas de OR17-40 l'ajout de l'antagoniste entraîne une augmentation de la population de récepteurs diffusant dans les petits domaines, et ce, avec un coefficient de diffusion plus faible (Jacquier, 2006). L'effet est encore plus notable pour le récepteur μ puisque que l'antagoniste entraîne, en plus du ralentissement des récepteurs et d'une modification des proportions, une diminution d'un facteur 3 de la taille des domaines (Daumas, non publié). Le comportement des récepteurs suite à la liaison des antagonistes semble donc plus complexe que prévu et mériterait d'être étudié de manière plus approfondie.

L'effet des agonistes est beaucoup plus étudié, et également plus constant. Une diminution de la proportion de récepteurs capables de diffuser à longue distance est obtenue dans le cas des récepteurs hormonaux LH et GnRH (Horvat, 1999 ; Nelson, 1999). Le récepteur NK2 voit la taille des domaines dans lesquels il est confiné diminuer de 420 à 170 nm de rayon (Cézanne, 2004). Le récepteur NK1, de la même famille, est présent dans des domaines dont la taille diminue au cours des 1000 secondes qui suivent la fixation de l'agoniste, pour aboutir à des domaines de tailles comparables à celles observées pour le NK2 (Lill, 2005). De même, après ajout de l'agoniste, les récepteurs OR17-40 sont présents en proportion plus importante dans les petits domaines (Jacquier, 2006). Dans chaque cas le coefficient de diffusion diminue. Ces petits domaines sont supposés être les puits de clathrine, ou les pré-puits de clathrine, qui entraînent l'internalisation des récepteurs activés. Cette hypothèse a été vérifiée pour le récepteur NK2 par colocalisation avec la β -arrestine (Cézanne, 2004).

Néanmoins tous les effets observés lors de l'activation d'un récepteur par son agoniste ne peuvent être imputés à ce phénomène. Ainsi, la diminution des tailles de domaines du récepteur LH activé est contrecarrée par la déplétion en cholestérol, et donc supposée liée à la présence de domaines rafts (Smith, 2006). De même, l'influence de la protéine G sur la

diffusion du récepteur 5HT1 a été mise en évidence. Ainsi lorsque l'agoniste se lie au récepteur, le coefficient de diffusion de ce dernier augmente, probablement à cause du découplage de la protéine G. Ceci permet aux auteurs de conclure à l'existence d'un pré-couplage du récepteur avec sa protéine G (Pucadyil, 2004).

5 – But de l'étude

Les travaux précédents réalisés dans l'équipe sur le récepteur hMOR ont permis de mettre en évidence une diffusion des protéines membranaires gouvernée par des interactions à longue distance entre ces protéines (Daumas, 2003a, b). Ces résultats ont été contestés par une autre équipe qui, dans les mêmes cellules, attribue le confinement du récepteur au réseau d'actine (Suzuki, 2005). Afin d'aller plus loin dans la compréhension de l'organisation membranaire du récepteur μ , il a été décidé d'analyser sa diffusion dans un environnement plus pertinent vis-à-vis de sa fonction, ceci en accord avec les observations de l'influence du contexte cellulaire obtenues sur d'autres récepteurs (Pucadyil, 2004; Sergé, 2002). Afin d'avoir une vue globale de cette organisation, il a été décidé d'analyser la diffusion du récepteur par deux techniques complémentaires que sont le Retour de Fluorescence Après Photoblanchiment (FRAP) et le Suivi de Particule Unique (SPT).

Les principes, avantages et inconvénients de chacune de ces approches seront développés dans la prochaine partie (chapitre II). Dans un premier temps, le récepteur hMOR, fusionné avec l'EGFP et un peptide T7 en N-terminal, a été surexprimé dans la lignée de neuroblastomes SH-SY5Y. Sa fonctionnalité a été vérifiée, et les caractéristiques particulières des cellules, déterminées (chapitre III). Par la suite, la dynamique du récepteur a été observée à l'état basal, en fonction de la température, de la perturbation de la liaison des protéines G et du cytosquelette. Ces résultats ont permis de proposer un modèle d'organisation du récepteur dans la membrane (chapitre IV, §1). Enfin, l'effet des ligands agonistes et antagonistes sur la diffusion de hMOR a été recherché (chapitre IV, §2). Les résultats obtenus par les deux approches seront discutés et les influences des différents paramètres sur l'organisation dynamique du récepteur hMOR analysés (chapitre V).

Chapitre II

TECHNIQUES

Principes et instrumentations des deux techniques utilisées pour l'étude de l'organisation membranaire du récepteur μ

L'analyse de la diffusion de récepteur a été réalisée par deux techniques complémentaires de biophysique que nous allons aborder dans ce chapitre. Le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) va d'abord être décrit, ainsi que le FRAP à rayon variable. L'analyse de ces retours qui permet de déterminer les paramètres de diffusion du récepteur sera explicitée, ainsi que le montage utilisé lors de ce travail. La technique du suivi de particule unique (SPT) est introduite dans une deuxième partie. Le principe général, le montage, l'obtention puis le traitement des trajectoires seront développés. Enfin la mise au point des conditions d'utilisation du SPT sur nos cellules, les problèmes rencontrés et leurs résolutions, seront expliqués.

Les premiers travaux qui ont traité de dynamique de constituants membranaires utilisaient la technique de Retour de Fluorescence Après Photoblanchiment (FRAP, (Axelrod, 1976a; Axelrod, 1976b; Poo, 1974)), qui va être développée dans la première partie de ce chapitre. La Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence (FCS) est apparue à la même époque (Koppel, 1976), mais a été peu utilisée jusqu'à ces dernières années à cause de limitations matérielles. C'est à présent une technique en plein développement (Briddon, 2004; Burns, 2005; Hegener, 2004). Une variante, le FCS à *waist* variable, a été récemment mis au point et permet de déterminer l'existence de domaines et leurs origines (Lenne, 2006; Wawrezinieck, 2005). Succinctement, ce procédé se base sur l'étude des fluctuations de fluorescence engendrées par les molécules entrant et sortant du volume d'observation. L'intérêt de cette technique réside essentiellement dans sa sensibilité. En effet, moins d'une dizaine de molécules traversant le volume confocal (femtolitre) suffisent à acquérir un signal. Les coefficients de diffusion sont ensuite obtenus par analyse d'une fonction d'auto-corrélation du signal de mesure (Chen, 2006a; Lagerholm, 2005). La troisième technique majeure utilisée pour mesurer la diffusion de molécules est le Suivi de Particule Unique (SPT pour Single Particle Tracking). Elle a été utilisée dans ce travail en parallèle du FRAP, et sera développée dans la deuxième partie de ce chapitre.

1 – Le retour de fluorescence après photoblanchiment : FRAP

1.1 – Principe

Le FRAP permet de suivre la diffusion d'un ensemble de molécules d'intérêt, dès lors qu'elles sont marquées par un fluorophore pouvant être photodégradé. C'est un outil de choix pour l'analyse de la diffusion d'un récepteur membranaire dans le plan de la membrane plasmique. Il permet de caractériser la diffusion de la protéine étudiée grâce à deux paramètres : le coefficient de diffusion (D , $\mu\text{m}^2/\text{s}$) et la fraction mobile (M , pourcentage de récepteurs capable de se déplacer).

Le principe repose sur la mesure de la fluorescence de l'échantillon avant (état initial I_i) et après (retour de fluorescence en fonction du temps I_∞) le photoblanchiment (I_{PB}). Ces mesures sont faites dans une zone de la membrane, de rayon R . Ce retour de fluorescence (fig. 18) indique au niveau de l'échantillon un échange des molécules d'intérêts entre celles dont la fluorescence a été dégradée et celle l'ayant préservée, c'est-à-dire celles extérieures à la zone de photoblanchiment. Ainsi les molécules qui ont été photodégradées sont peu à peu remplacées par des molécules encore fluorescentes.

Chaque retour de fluorescence obtenu peut être normalisé selon :

$$F(t) = \frac{I_{(t)} - I_{PB}}{I_i - I_{PB}} \quad (\text{Eq.6})$$

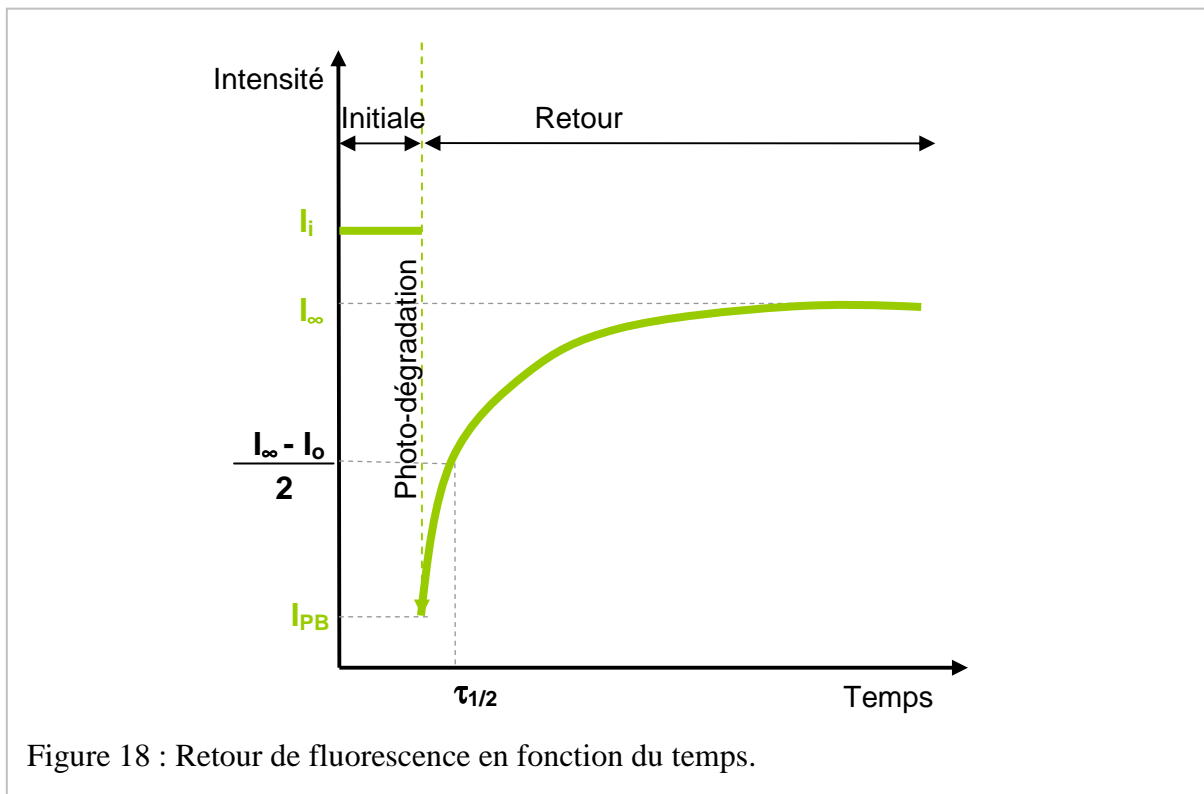
La fluorescence initiale prend donc la valeur de 1. La fraction mobile, qui correspond au pourcentage de molécules capables de diffuser à longue distance, est égale à la valeur du plateau, à F_∞ :

$$M = \frac{I_\infty - I_{PB}}{I_i - I_{PB}} \quad (\text{Eq.7})$$

A partir de cette valeur, le temps de demi-retour $\tau_{1/2}$, représentant le temps nécessaire pour que la moitié des molécules capables de diffuser soient revenues dans la zone d'observation, est obtenu. Enfin le coefficient de diffusion expérimental est égal à :

$$D_{\text{exp}} \approx \frac{R^2}{4\tau_D} \quad (\text{Eq.8})$$

où $\tau_D \approx \frac{\tau_{1/2}}{0,88}$ (Axelrod, 1976a).



En pratique, ces analyses se font dans Excel, grâce au programme *EasyFrap* écrit par Serge Mazères sous Visual Basic. Ce programme calcule les paramètres D et M à partir de

l'ajustement des données expérimentales par l'équation de Soumpasis (Lopez, 1988; Soumpasis, 1983) en utilisant l'algorithme de minimisation de Powell (Powell, 1964). Les valeurs initiales de D et M, qui servent de point de départ à la minimisation, sont données par l'utilisateur. Le résultat est obtenu lorsque la somme des carrés des écarts entre la solution et les données est la plus faible (Lopez, 1988). Ainsi chaque courbe de retour de fluorescence permet de déterminer un couple (M, D_{exp}).

1.2 – Le FRAP à rayon variable : FRAPrv

Le FRAP à rayon variable utilisé dans ce travail consiste à effectuer des analyses de retour de fluorescence en modifiant la surface de la zone d'observation. Des simulations numériques, ainsi que des expériences sur système modèle confiné réalisées dans l'équipe (Salome, 1998) ont permis de calibrer cet outil qui permet de déterminer l'existence, ou non, d'une organisation en domaines, et les valeurs de taille et de coefficient de diffusion à l'intérieur et à l'extérieur des domaines.

1.3 – Détermination des paramètres

Une trentaine de retours de fluorescences est enregistré à quatre ou cinq rayons d'observations. Différentes étapes d'analyse sont nécessaires pour extraire toutes les informations. Les fichiers sont tout d'abord analysés de manière individuelle (fichier par fichier, rayon par rayon), puis de manière plus globale (regroupement des fichiers et analyse en fonction des rayons). Enfin le fichier regroupé est étudié selon l'hypothèse de l'existence de deux populations. A partir des différentes informations obtenues, un modèle d'organisation des récepteurs peut être mis en place.

1.3.1 – Analyse individuelle des retours de fluorescence

L'analyse individuelle des retours de fluorescence permet de rejeter ceux qui ne sont pas ajustés correctement et qui présentent des valeurs incohérentes (par exemple $M > 100\%$). Un tri s'effectue ensuite sur la base des fractions mobiles obtenues, de manière à éliminer les fichiers ayant des valeurs extrêmes. On a considéré que les fichiers à regrouper devaient avoir une dispersion maximum de 20 %, centrée autour de la moyenne des M. Peu de fichiers sont ainsi rejetés, ce qui permet de ne pas orienter le résultat final. Le regroupement consiste en la moyenne point à point de tous les fichiers d'un même rayon lors d'une condition. Il est permis

du fait de la normalisation préalable des mesures. Les retours retenus sont regroupés et ce fichier est ensuite analysé.

L'analyse comparative de regroupements de fichiers préalablement triés ou non a confirmé que le résultat final n'était pas biaisé par le tri tel qu'il est effectué. Néanmoins il permet de diminuer la barre d'erreur du couple (D, M) obtenue, et également par la suite l'erreur sur la taille des domaines.

1.3.2 – Analyse par rayon

→ La fraction mobile

Le fichier regroupé est analysé selon le même principe qu'un fichier individuel, et permet de déterminer un couple (M, D_{exp}) pour chaque rayon d'observation R. Les couples obtenus sont alors étudiés en fonction du rayon d'observation.

- Dans le cas où les molécules sont libres de diffuser à longue distance ; la fraction mobile est constante et ce, quelle que-soit la taille de la zone observée. La fraction immobile (M_I) correspondant aux molécules incapables de diffuser dans le plan (fig. 19A) est alors égale à :

$$M_I = (1 - M) \quad (\text{Eq. 9})$$

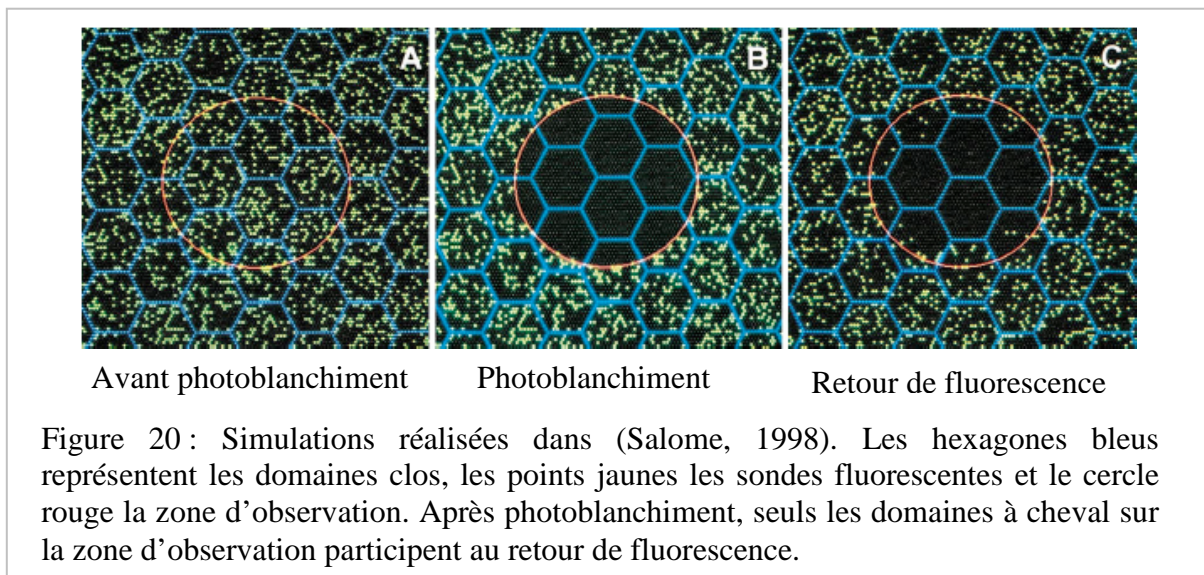
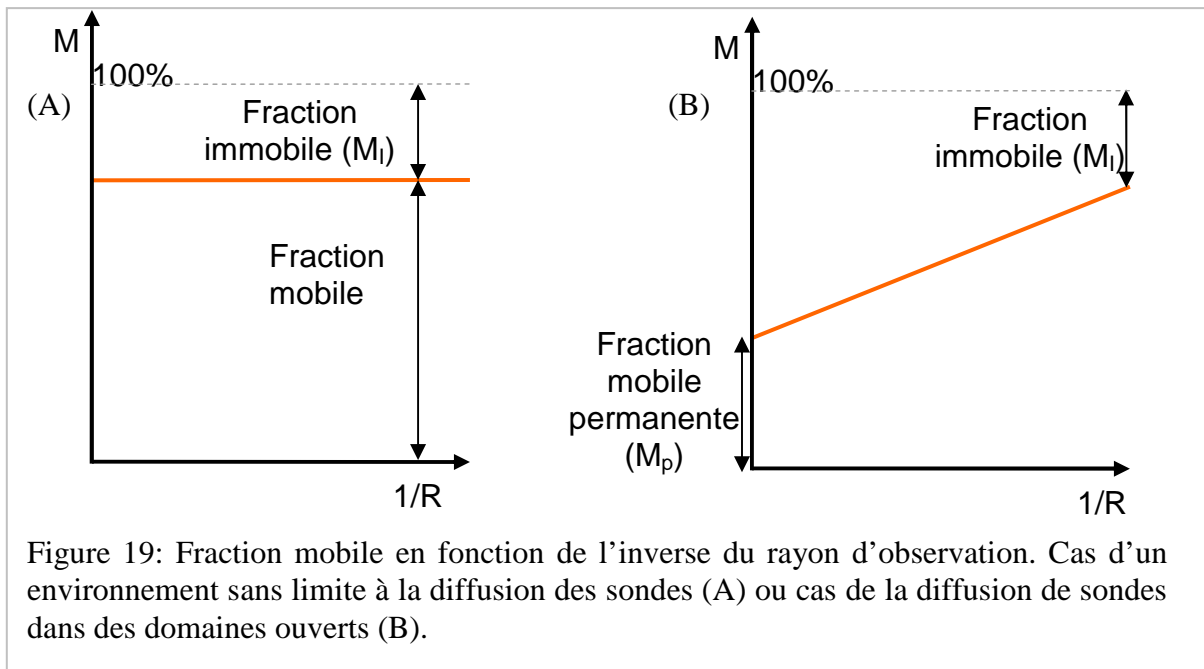
- Au contraire, s'il existe des contraintes au déplacement des molécules, la fraction mobile et le coefficient de diffusion seront variables en fonction du rayon d'observation. L'analyse d'un système modèle (sondes dans des domaines clos : billes de silice), ainsi que des simulations numériques menées dans l'équipe (fig. 20), ont permis de déterminer les équations régissant la diffusion des sondes par FRAPrv (Salome, 1998).

La fraction mobile de molécules compartimentées varie linéairement en fonction du rayon selon :

$$M = A \times \frac{r}{R} + M_p \quad (\text{Eq. 10})$$

Où A est une constante (égale à 0,634), r le rayon des domaines, R le rayon de la zone d'observation et M_p la fraction mobile permanente (fig. 19B). Dans le cas où les domaines sont strictement clos, cette valeur est égale à zéro. Au contraire dans le cas où ces domaines sont ouverts, une proportion de sondes est capable d'en sortir (fuite) qui constitue la fraction mobile permanente.

Cette proportion de molécules capables de diffuser à longue distance peut être reliée à un pourcentage d'ouverture du périmètre des domaines. Il s'avère qu'une ouverture faible des domaines (4 %) permet à une assez grande proportion de molécules de diffuser à longue distance (33 %). Enfin la différence entre 100% de retour et la valeur de M trouvée pour le plus petit rayon permet d'appréhender une valeur approchant de la fraction immobile (fig.19B).



→ Le coefficient de diffusion

Les variations du coefficient de diffusion en fonction de la présence des domaines, de leur taille et du rayon d'observation ont également été analysées (Salome, 1998).

- Lorsque la membrane n'est pas compartimentée, le coefficient de diffusion D_{exp} obtenu est invariant avec le rayon d'observation. On a alors :

$$D_{\text{réel}} = D_{\text{exp}} \quad (\text{Eq. 11})$$

- En présence de domaines, le coefficient de diffusion expérimental D_{exp} varie avec la taille de la zone d'observation et peut être corrigé en utilisant la taille des domaines (r) et celle de la zone d'observation (R) selon :

$$D_{\text{reel}} = \frac{1}{2} D_{\text{exp}} \times \left(\frac{r}{R} \right)^2 \quad (\text{Eq.12})$$

Une fois corrigé, le coefficient de diffusion $D_{\text{réel}}$ devient invariant en fonction du rayon d'observation.

Les études sur système modèle et par simulation ont donc permis de caractériser les variations des deux paramètres M et D en fonction du rayon d'observation en présence de domaines. Les valeurs obtenues lors des expériences sont traitées selon les équations explicitées ci-dessus et permettent donc de déterminer l'existence et la taille de domaines.

→ Tailles relatives de la cellule, de la zone d'observation et des domaines

Il est essentiel pour effectuer un retour de fluorescence de se placer dans les conditions dites *de réservoir infini* c'est-à-dire lorsque le réservoir de molécules fluorescentes (c'est-à-dire la cellule) est au moins 5 fois plus grand que l'aire d'observation (surface observée \ll surface cellule). Lorsqu'elles sont arrondies, les SH-SY5Y ont un diamètre de 12 μm , soit une surface totale d'environ 450 μm^2 . La zone d'observation maximale utilisée dans cette étude a un rayon de 3,45 μm , soit une surface 10 fois plus faible que celle de la cellule. Cette condition implique par ailleurs que deux retours de fluorescence ne peuvent être réalisés sur une même cellule.

En présence de domaines il est également essentiel de vérifier les tailles relatives de la zone d'observation (R) et des domaines (r).

- Quand $R > r$ alors les équations développées ci-dessus s'appliquent
- Quand $R < r$ alors la fraction mobile ne varie plus linéairement selon l'inverse du rayon d'observation, mais selon :

$$M = \frac{c^2 - R^2}{c^2} \quad (\text{Eq. 13})$$

Où c est le rayon de la cellule et R le rayon d'observation. Dans les tailles de zones d'observation utilisées ici, ce deuxième cas se traduit par une relative stabilisation de la

fraction mobile lorsque r est proche de R , c'est-à-dire l'obtention d'un plateau aux petits rayons, sur le graphique : M en fonction de $1/R$.

→ Erreur sur les paramètres

Les paramètres D_{exp} et M sont calculés par le programme et donnés avec un intervalle de confiance de 95%. L'erreur sur la taille des domaines dépend de l'alignement de M en fonction de $1/R$, et est estimée par utilisation d'une régression linéaire dans PRISM. L'erreur sur le $D_{\text{réel}}$ recalculé à partir de D_{exp} selon l'équation (12) prend en compte l'erreur faite sur le D_{exp} et sur la taille des domaines :

$$\Delta D_{\text{réel}} = D_{\text{réel}} \left[\frac{\Delta D_{\text{exp}}}{D_{\text{exp}}} + 2 \frac{\Delta \text{Pente}}{\text{Pente}} \right] \quad (\text{Eq. 14})$$

Dans le cas où il n'y a pas de domaines, les fractions mobiles et le coefficient de diffusion sont stables en fonction du rayon d'observation. Les valeurs citées seront donc les moyennes avec l'écart type comme barre d'erreurs.

Il faut noter que l'erreur faite sur la mesure des fractions mobiles est plus faible que celle sur le coefficient de diffusion expérimental car la fraction mobile est obtenue à partir d'un plus grand nombre de points (plateau du retour de fluorescence).

L'analyse des fichiers regroupés permet de diminuer les erreurs sur chaque paramètre. Néanmoins, afin d'appréhender les variations liées aux cellules, chaque expérience est réalisée en parallèle d'un témoin. Ceci permet de comparer directement les résultats et de distinguer des variations fines entre la condition testée et le témoin.

1.3.3 – Analyse à deux populations

Par la suite, les retours de fluorescence regroupés peuvent être analysés en considérant l'existence de deux populations. Deux coefficients de diffusion sont alors obtenus :

- L'un correspond aux molécules diffusant à longue distance, il est invariant avec le rayon d'observation :

$$D_{1\text{exp}} = D_{1\text{réel}} = D_{\text{libre}} \quad (\text{Eq. 15})$$

- Le deuxième coefficient de diffusion obtenu correspond aux molécules diffusant à l'intérieur des domaines. Il est variable en fonction du rayon d'observation et doit être corrigé selon l'équation (12) pour trouver le coefficient $D_{2\text{réel}}$ qui devient invariant avec R .

$$D_{2_{reel}} = \frac{1}{2} D_{2_{exp}} \times \left(\frac{r}{R} \right)^2 = D_{conf}. \quad (\text{Eq.12bis})$$

La proportion P de chacune de ces populations est également déterminée.

Pour conclure à l'existence de deux populations, il est important de considérer et de comparer la globalité des paramètres trouvés selon les deux types d'ajustement (une et deux populations). La présence de deux populations est avérée lorsque qu'il y a amélioration de la somme des carrés des écarts, invariance d'un des deux D_{exp} avec le rayon d'observation et stabilisation du second après correction avec l'équation (12). Si l'un de ces trois critères n'est pas respecté, le modèle d'ajustement à une population, plus simple, sera préféré.

Néanmoins, l'ajustement à deux populations ne pourra pas distinguer deux populations existantes dans certains cas. Citons par exemple la présence majoritaire d'une population par rapport à l'autre ($P = 90\%$), ou bien si l'un des groupes est trop lent pour la résolution de l'appareil. De même si les deux coefficients de diffusion sont très proches, il sera difficile de les distinguer.

1.4 – Montage et conditions d'expériences

1.4.1 – Montage

Le montage utilisé dans l'équipe est constitué d'un laser à Argon (longueur d'onde d'émission : 488 nm), de filtres atténuateurs, d'un microscope droit (objectif x 63, immersion à huile), de deux obturateurs, d'un photomultiplicateur (PM), d'un amplificateur et enfin d'un ordinateur. Le programme d'acquisition a été programmé sous LabView par Serge Mazères. Le montage de la lamelle se fait sur un support spécialement adapté (fig. 21 A et B).

Le faisceau du laser est séparé en deux : le faisceau principal (de dégradation) est utilisé pour la phase de photo-blanchiment, alors que le faisceau secondaire (de mesure) sert à mesurer la fluorescence de l'échantillon durant les phases I_i et de retour. Trois paramètres (puissance du laser, filtres atténuateurs et temps de photoblanchiment) permettent de moduler la puissance effective du laser sur l'échantillon de manière à ne pas dégrader la fluorescence durant les phases d'observation, et à contrôler le pourcentage de photo-blanchiment effectué. Le changement de faisceau est contrôlé par l'ordinateur qui ouvre l'obturateur O_1 , tout en maintenant fermé O_2 pour protéger le photomultiplicateur.

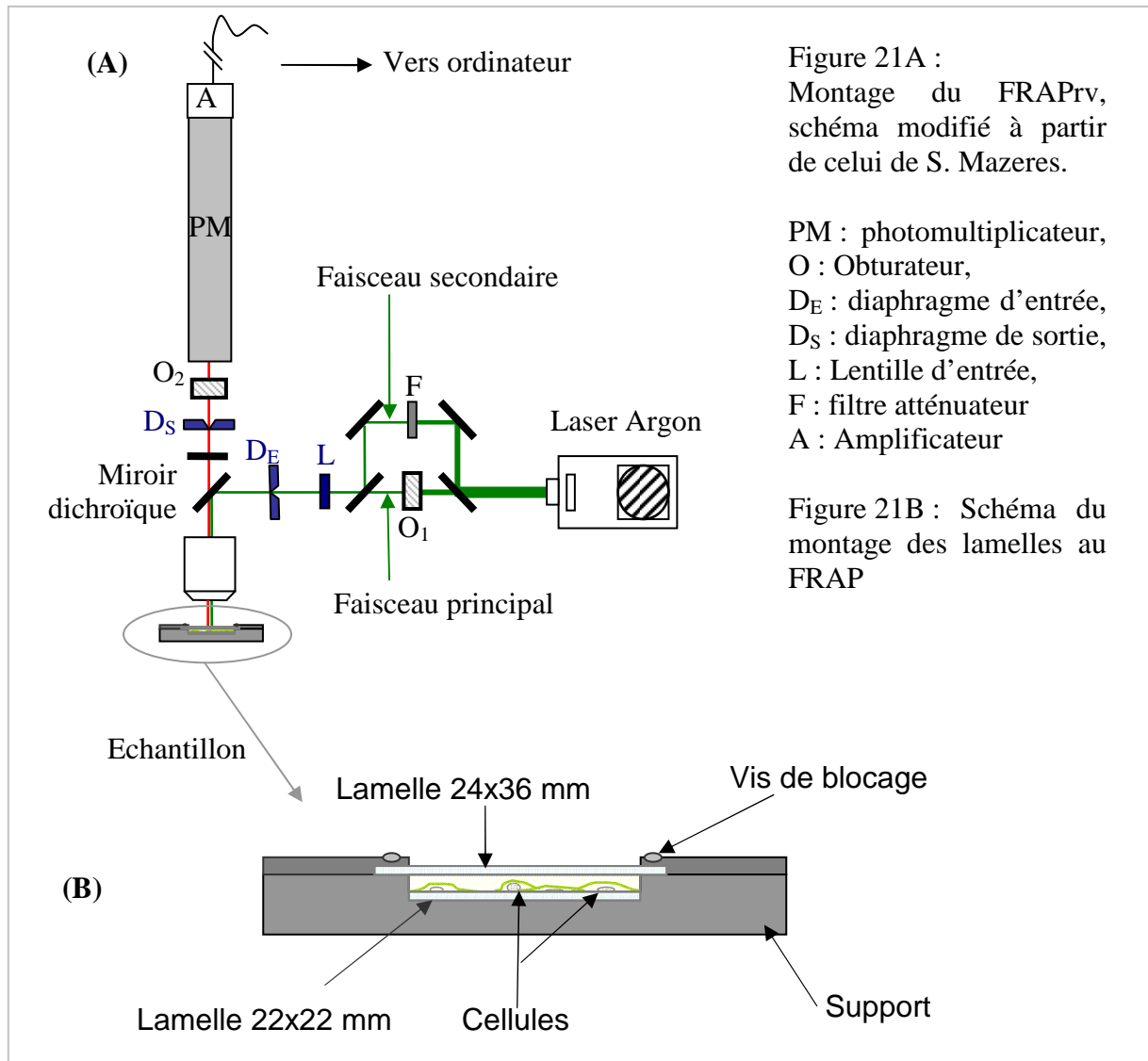


Figure 21A :
Montage du FRAPv,
schéma modifié à partir
de celui de S. Mazeres.

PM : photomultiplicateur,
O : Obturateur,
D_E : diaphragme d'entrée,
D_S : diaphragme de sortie,
L : Lentille d'entrée,
F : filtre atténuateur
A : Amplificateur

Figure 21B : Schéma du
montage des lamelles au
FRAP

Chaque taille de zone d'observation R est définie grâce à deux diaphragmes (dits d'entrée et de sortie) spécialement calibrés. Le choix de la lentille d'entrée du microscope dépend des diaphragmes utilisés (tableau 2). Cette dernière a pour rôle d'élargir le faisceau laser qui passe ensuite à travers le diaphragme d'entrée, placé dans le plan objet du microscope. Ce diaphragme permet de ne laisser passer que le centre du faisceau, ce qui définit le rayon de la tache sur l'échantillon. De plus ce montage permet une analyse en mode confocal et une uniformité d'éclairement de la tache. Enfin, le diaphragme de sortie, placé dans le plan image, permet d'éliminer la fluorescence qui ne provient pas de la zone éclairée. Seule la fluorescence du plan focal est ainsi prise en compte par le photomultiplicateur (Koppel, 1976). L'alignement de la lentille et des diaphragmes se fait à chaque changement de rayon par réglage à l'optimum d'intensité sur système modèle (multicouche plane de lipides fluorescents).

Rayon de la tache d'observation (μm)	Lentille (focale en nm)	Entretoise (mm)	Diaphragme d'entrée (ϕ μm)	Diaphragme de sortie (ϕ μm)
1,40	68	27,5	67	210
1,95	68	27,5	95	302
2,57	160	25	124	404
2,95	160	25	142	450
3,45	160	25	165	510

Tableau 2 : Tableau de référence pour le choix des diaphragmes d'entrée et de sortie, et de la lentille en fonction de la taille de la zone d'observation souhaitée.

Enfin la température de l'échantillon peut être modulée grâce à un système thermostaté au niveau de la platine (élément Peltier). Ce montage, déjà présent dans le matériel de l'équipe, a été remis en état de fonctionner au niveau de l'électronique, par Jean-Louis Druilhe. La lamelle (montée sur une lame, cf. annexe Matériel et méthodes) est placée entre deux éléments Peltiers qui régulent la température, eux-mêmes étant refroidis par deux ventilateurs. Afin de calibrer au mieux la température ressentie par les cellules, un abaque (cf. annexe Matériel et méthodes) a été effectué en plaçant la sonde de température entre lame et lamelle, et non sous la lame (sonde référence du système). Ce système a été utilisé pour les études à 14°C et à 37°C en FRAPrv.

1.4.2 – Limites et contrôles afférents à la technique

Certaines limites de la technique doivent être gardées en mémoire. Tout d'abord l'analyse de la diffusion se faisant en deux dimensions, la fluorescence doit être limitée au plan de la membrane et ne pas être présente dans le cytoplasme, ce qui est le cas des cellules utilisées. La nécessité de rester en condition de réservoir infini a déjà été évoquée. La durée du photoblanchiment doit être faible par rapport à la durée d'analyse (inférieure à 5 % du temps de demi-retour), ceci afin d'éviter que le retour des molécules fluorescentes dans l'aire d'observation ne commence avant la prise de mesure. La dégradation de la fluorescence doit également être comprise entre 35 et 65 % de la fluorescence initiale. Ici, $\tau_{1/2}$ est généralement compris entre 1,5 et 3 secondes et les temps de photoblanchiment utilisés sont de 20 à 40 ms. En outre la durée du retour doit être comprise entre 5 et 10 fois le temps de demi-retour, soit entre 15 et 30 secondes environ. Enfin, lors des phases de mesure la fluorescence ne doit pas

être dégradée par le faisceau lumineux : la pente sur I_i (3 secondes) est donc calculée et doit être inférieure à 10 % pour que le retour soit considéré valable (Dupou, 1987b ; Lopez, 1988).

1.4.3 – Extrapolation du point I_{PB}

Le principe du FRAP (explicité ci-dessus) suppose que tous les points de la courbe de l'intensité de fluorescence en fonction du temps soient connus. Pour des raisons pratiques, le point I_{PB} ne peut être mesuré. En effet, lors de l'excitation de l'échantillon par le faisceau principal, l'obturateur O_2 est fermé et ce, avec un différentiel de 4 ms afin de protéger le PM de l'illumination. De plus, les premières 60 millisecondes sont rejetées à cause d'un problème de *rebond* de la courbe, c'est-à-dire une instabilité de la mesure lors de la réouverture du PM. Les trente-deux premiers points du retour ne sont donc pas mesurés.

Il est alors nécessaire de recalculer le point I_{PB} . Aux temps très courts le début du retour peut être assimilé à une droite, l'extrapolation de I_{PB} était précédemment effectuée par une régression linéaire sur les 50 premiers points. Les premières analyses sur cellules ont révélé une grande proportion de rejet de retours due à des valeurs négatives sur les premiers points de la courbe normalisée. Il est apparu que le I_{PB} était régulièrement surestimé, aboutissant ainsi à des valeurs $F(t)$ négatives, théoriquement impossibles. Des analyses sur multicouches lipidiques ont confirmé cette mauvaise extrapolation du I_{PB} , un nouveau mode de calcul a donc été mis en place, utilisant un polynôme du second degré sur les 200 premiers points du retour. Cette nouvelle extrapolation a été validée sur multicouches puis cellules, et à fait chuter les rejets de fichiers dus à un début de courbe normalisée négatif. Elle est utilisée dans tout ce travail.

1.4.4 – Analyse sur système modèle

Avant d'analyser le retour de fluorescence sur cellules, l'appareillage et le dépouillement ont été vérifiés sur des multicouches planes de lipides fluorescents. Le coefficient de diffusion du lipide suivi (C_{12} -NBD-PC dans POPC) ainsi que la fraction mobile ont été trouvés constants en fonction du rayon d'observation, ce qui est attendu pour un système modèle non compartimenté. Près de 100 % des lipides sont capables de revenir dans la zone d'observation, avec des coefficients de diffusion de $3,1 \pm 1,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (moyenne de 3 expériences, sur 6 rayons) cohérents avec la littérature (Dupou, 1987b; Tocanne, 1994; Vaz, 1982a; Vaz, 1982b).

2 – Le suivi de particule unique : SPT

2.1 – Principe

2.1.1 – Principe général

Le suivi de particule unique repose sur le marquage spécifique de la molécule d'intérêt par une particule. Cette particule est suivie par vidéomicroscopie, couplée à l'analyse d'images. Un couple de coordonnées (x,y) est obtenu pour chaque image, retraçant la trajectoire suivie par la particule en fonction du temps, c'est-à-dire la trajectoire de la molécule sur laquelle elle est fixée. Cette trajectoire est alors analysée avec différents outils mathématiques (déplacement quadratique moyen, probabilité de confinement en fonction du temps) qui permettent de déterminer le mode de diffusion suivi par la molécule d'intérêt (Chen, 2006a). L'obtention d'une centaine de trajectoires permet d'obtenir une vue globale de la diffusion des molécules d'intérêts. C'est une technique qui est particulièrement adaptée au suivi de molécules membranaires qui sont accessibles aux particules (Saxton, 1997).

2.1.2 – Différents types de marquage des molécules d'intérêts

Différents types de marquage des molécules d'intérêts existent soit par une particule visible en microscopie optique (billes de latex, colloïdes d'or) ou de fluorescence (*quantum dots*), soit par une molécule fluorescente (suivi de molécule unique ou SMT). Chaque marquage présente des avantages et des inconvénients. Les molécules (fluorescentes) sont généralement plus petites que les particules mais ne peuvent être suivies que pendant quelques secondes avant l'extinction de leur fluorescence. Au contraire les particules permettent des acquisitions de trajectoire jusqu'à quelques minutes. Néanmoins leur taille reste un inconvénient, ainsi que la nécessité de les fonctionnaliser pour permettre leur fixation spécifique. L'utilisation de particules fluorescentes est en expansion grâce à la découverte des *quantum dots* qui cumule l'avantage d'une taille plus petite avec un bleaching limité (Dahan, 2003).

Les colloïdes d'or ont d'abord été utilisés en microscopie électronique grâce à leur forte densité qui les rend facilement visibles (Goodman, 1980). Ils ont ensuite été popularisés pour les études en microscopie optique notamment par De Brabander qui a mis au point les techniques de vidéo-imagerie nécessaires à l'utilisation de telles particules (De Brabander, 1989; De Brabander, 1986 ; De Brabander, 1991). Comme pour les autres particules, des précautions sont nécessaires pour l'utilisation des colloïdes en particulier lors de leur

fonctionnalisation qui peut s'avérer complexe. Ainsi le nombre d'anticorps fixés par colloïde influence le coefficient de diffusion mesuré, probablement en entraînant la formation d'agrégats de molécules d'intérêts sous le colloïde (Lee, 1991 ; Lee, 1993). Il est donc important de se rapprocher au maximum de la présence d'un seul anticorps par colloïde. Ceci a l'inconvénient d'entraîner une moindre fixation des colloïdes sur les cellules. Il s'agit donc d'un compromis à trouver.

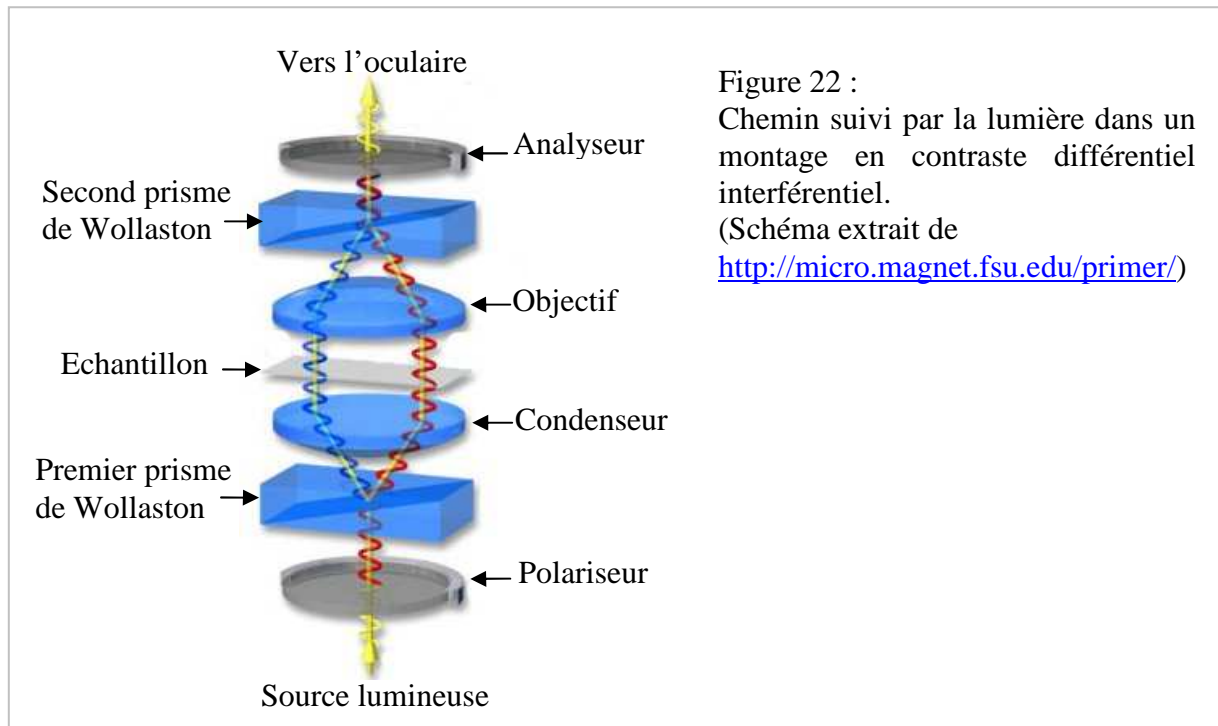
Finalement il est essentiel que les déplacements du colloïde reflètent ceux de la protéine, et non l'inverse. Cette condition est remplie quand le milieu qui entoure le colloïde est moins visqueux (le tampon) que le milieu qui entoure la protéine (la membrane). La présence d'un glycocalyx membranaire, qui modifie la densité du milieu dans lequel se déplace le colloïde, représente une exception qui peut perturber la diffusion de la protéine membranaire par le biais du ralentissement du colloïde (Lee, 1993).

2.2 – Montage

2.2.1 – Le contraste de Nomarski

La vidéomicroscopie couplée à l'analyse d'images permet de déterminer avec précision (de l'ordre de la dizaine de nanomètres) le centre de masse des colloïdes dont la taille est inférieure à la limite de résolution des microscopes. Le contraste différentiel interférentiel (DIC), ou contraste de Nomarski (du nom de son inventeur), permet d'obtenir des images très contrastées d'échantillons transparents, à partir du moment où il contient des zones dans lesquelles les indices de réfraction varient. Il a donc été utilisé dans un premier temps pour observer les structures fines des cellules ou des bactéries (Allen, 1982; Volker, 1977). Son utilisation nécessite d'aligner le microscope selon la méthode de Köhler qui permet de créer une illumination maximale et homogène de l'échantillon. Le contraste de Nomarski se base sur un jeu de prisme dit de Wollaston et sur un couple polariseur / analyseur. La lumière émise par la source lumineuse est tout d'abord polarisée par le polariseur, puis est séparée par la traversée du premier prisme en deux faisceaux polarisés de façon perpendiculaires l'un par rapport à l'autre. Le condenseur focalise les deux faisceaux dans le plan d'observation. Ils traversent alors l'échantillon, ce qui modifie leur chemin optique. Cette modification dépend principalement de l'épaisseur et de l'indice de réfraction de l'objet traversé. Les deux faisceaux traversent ensuite l'objectif et sont recomposés par le second prisme de Wollaston. La dernière étape consiste à traverser l'analyseur, orienté à 90° par rapport au polariseur initial (fig. 22). Plus les deux faisceaux polarisés ont traversé des

échantillons d'épaisseur et d'indices de réfraction différents, plus l'intensité obtenue après leur passage dans l'analyseur est importante.

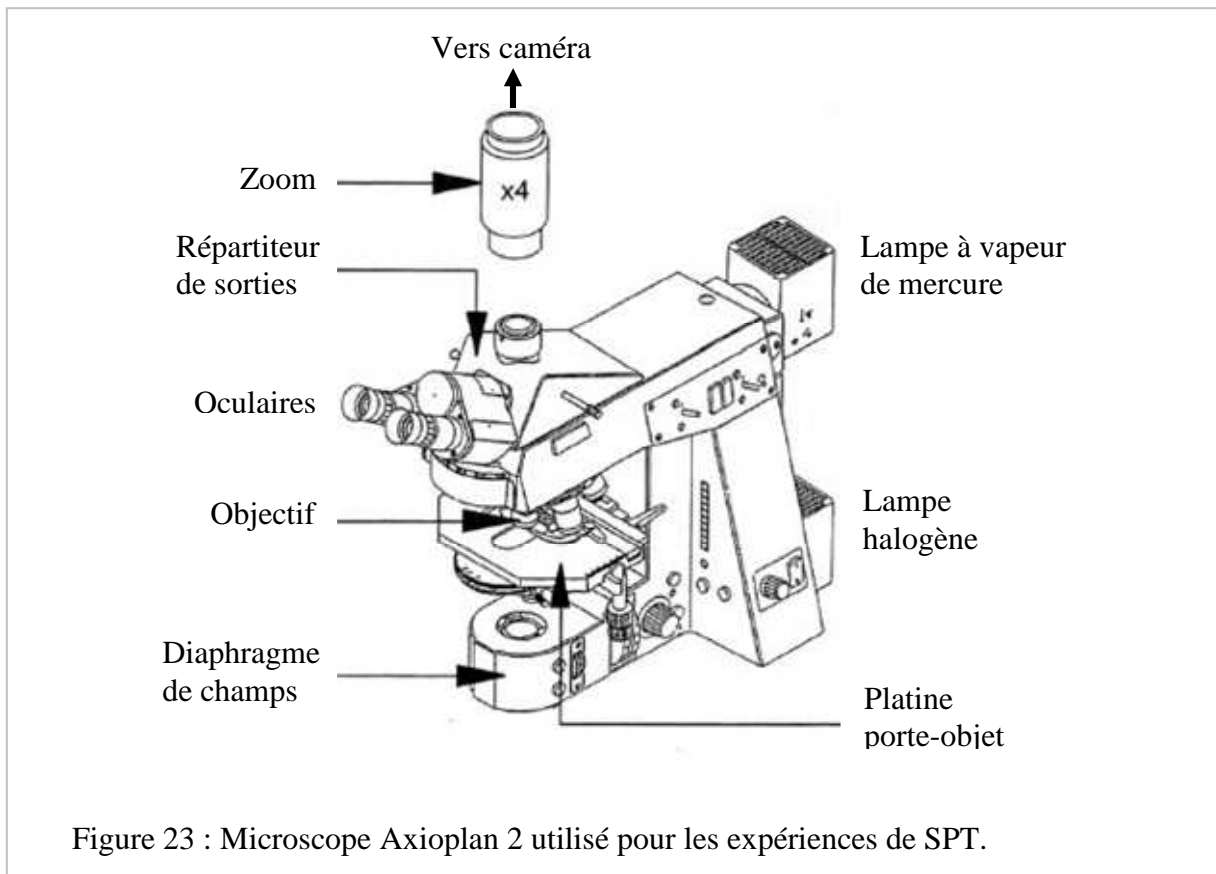


L'image obtenue fait apparaître de forts contrastes correspondant aux contours de l'objet observé. Les structures observées apparaissent avec des différences de niveau de gris (un côté apparaissant blanc et l'autre noir), produisant un effet de faux relief. Cet effet peut être modulé par le positionnement du second prisme de Wollaston, et est utilisé pour la détection des particules.

2.2.2 – Appareillage utilisé

Le montage utilisé dans l'équipe comprend un microscope Zeiss Axioplan II, une lampe à vapeur de mercure pour les observations en fluorescence, une lampe halogène, une caméra CCD 2400-75i avec processeur d'images Argus 20 (Hamamatsu) ainsi qu'un magnétoscope numérique DVCAM DSR 30P (Sony).

Les observations ont été réalisées avec un objectif à immersion d'huile de grossissement X 63 Plan-Neofluar d'ouverture numérique 1,3. Un grossissement supplémentaire (X 4) est rajouté en amont de l'entrée de la caméra ce qui permet d'aboutir à un grossissement final de X 252 (fig. 23). Afin de l'isoler de toute vibration parasite le microscope est placé dans une pièce climatisée sur une table en marbre, elle-même posée sur un châssis antivibratoire, et isolé de ce dernier par des *silent-blocs*.



Les différents éléments du dispositif de suivi de particule unique sont présentés en figure 24. L'image formée par le microscope est acquise par la caméra et transmise au processeur d'images. Ce dernier permet de soustraire le bruit de fond et d'effectuer un recadrage dynamique des niveaux de gris en temps réel. Ces opérations, suivies grâce au moniteur de contrôle, entraînent une première amélioration du ratio signal sur bruit. Les images sont ensuite enregistrées sur cassette par le magnétoscope, puis après numérisation (station Hollywood, IEC) traitées avec un logiciel d'analyses d'images (Optimas, MediaCybernetics). Ce dispositif a été modernisé au cours de ce travail afin de permettre le traitement en temps réel des séquences d'images (ordinateur équipé d'une carte d'acquisition pilotée par Labview 6.1, Imaq National Instruments). Dans ce cas les images sont traitées par l'ordinateur et enregistrées par le magnétoscope en même temps, toujours après passage par le processeur d'images. La correspondance entre les pixels et la taille en nm a été mesurée en fonction du mode de numérisation (tableau 3) :

	Post-traitement	Temps réel
x	35,0	32,2
y	32,6	32,9

Tableau 3 : Valeurs en nm correspondant à 1 pixel sur l'axe des x et des y en fonction du mode de traitement des images.

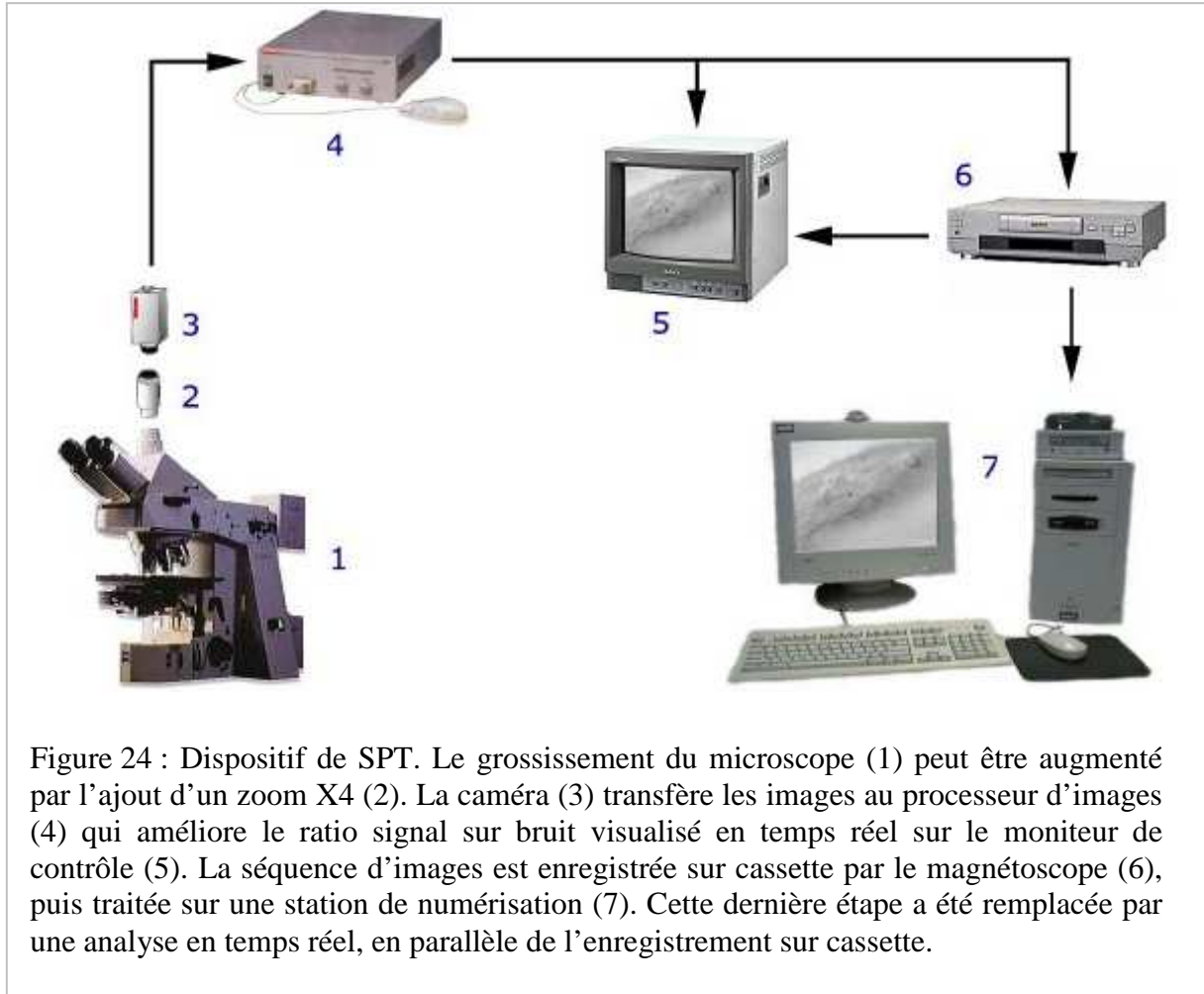


Figure 24 : Dispositif de SPT. Le grossissement du microscope (1) peut être augmenté par l'ajout d'un zoom X4 (2). La caméra (3) transfère les images au processeur d'images (4) qui améliore le ratio signal sur bruit visualisé en temps réel sur le moniteur de contrôle (5). La séquence d'images est enregistrée sur cassette par le magnétoscope (6), puis traitée sur une station de numérisation (7). Cette dernière étape a été remplacée par une analyse en temps réel, en parallèle de l'enregistrement sur cassette.

2.2.3 – Détection des particules d'or

La détection des particules est une étape particulièrement importante dans les études en SPT. La diffusion de la lumière sur les particules d'or (de diamètre 40 nm) permet d'obtenir, en contraste de Nomarski, une image contrastée dont le diamètre apparent est d'environ 200 nm (De Brabander, 1986). Il est ensuite nécessaire de traiter les images afin d'en extraire la trajectoire du colloïde c'est-à-dire un couple de coordonnées (x,y) correspondant au centre de masse, pour chaque image. Deux traitements ont été utilisés au cours de cette thèse : le post-traitement ou le traitement en temps réel.

→ En post-traitement

La séquence d'images précédemment enregistrée est numérisée puis traitée par différentes étapes (fig. 25). Une zone d'intérêt contenant le colloïde (ROI pour *Region Of Interest*) est délimitée sur laquelle se feront les différentes opérations. Cette ROI doit être la plus petite possible. Dans un premier temps un recadrage des niveaux de gris est effectué afin d'améliorer le contraste du colloïde. Un filtre qui moyenne l'intensité des pixels (3 x 3) est ensuite appliqué, dans le but de diminuer le bruit généré lors de l'étape précédente. La troisième étape consiste à binariser l'image, c'est-à-dire à réduire les 256 niveaux de gris à 2 niveaux : blanc et noir. Il est essentiel que seul le colloïde apparaisse alors en noir sur fond blanc, et non pas des reliefs de la cellule. Enfin, en raison d'un pré-requis du logiciel pour trouver les contours automatiquement, les intensités de l'image sont inversés (le colloïde devient blanc sur fond noir) et le contour du colloïde tracé. Ce contour est utilisé sur l'image de départ pour calculer le barycentre pondéré des niveaux de gris dans la zone déterminée (Daumas, 2003a). Ce traitement est réalisé sur chaque image de la séquence, en conservant la même ROI, par des programmes développés précédemment dans l'équipe et le logiciel Optimas v6.2 (MediaCybernetics, 1997). Chaque image permet d'obtenir un couple de coordonnées (x,y) du colloïde, l'ensemble de la séquence correspond à la trajectoire.

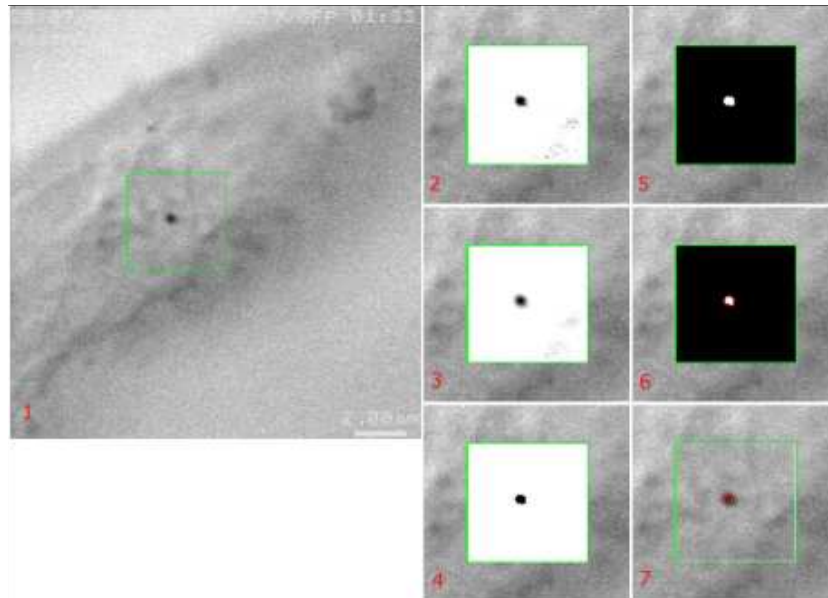
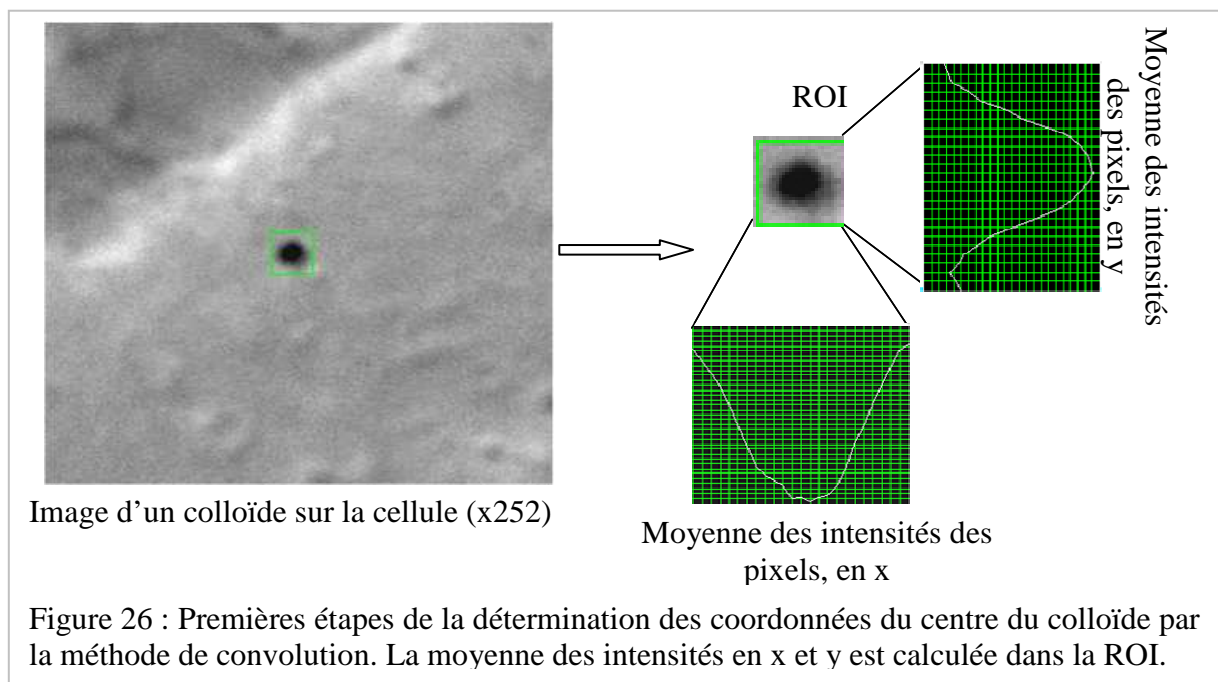


Figure 25 : Traitement d'une image par la station de numérisation (post-traitement) (1) Image brute, détermination de la ROI (2) Ajustement des niveaux de gris (3) application du filtre moyen (3x3 pixels) (4) Binarisation (5) Inversion noir / blanc (6) Détermination du contour (7) calcul du barycentre sur l'image brute dans la zone déterminée

Différents problèmes peuvent se poser. Le colloïde peut être trop clair, et donc ne peut pas être extrait du fond gris de la cellule dans certaines images. Dans d'autres cas il peut y avoir des reliefs cellulaires qui apparaissent aussi foncés que le colloïde, ce qui aboutit à la détection de deux centres de masse, et donc de deux couples de coordonnées pour une seule image. Les trajectoires sont donc vérifiées avant d'être analysées. Les doublons sont éliminés, en ne conservant que le couple (x,y) le plus proche des coordonnées de l'image précédente. Les trous sont comptés et s'ils sont trop nombreux (en nombre supérieur à 10 % du nombre total d'images), la trajectoire est rejetée. La dernière vérification pour accepter une trajectoire est de regarder les séquences d'images en accéléré afin de déterminer si la cellule est bien immobile sur le temps de l'expérience.

→ En temps réel

Un système de traitement en temps réel des trajectoires a été mis en place au cours de ce travail par Frédéric Filoche à partir d'un programme développé par Franck Artzner (GMCM, Rennes) sous Labview. Les images sont traitées en temps réel par l'ordinateur dès leur enregistrement, soit en moins de 40 ms. Deux systèmes de détection du colloïde sont alors possibles. Le premier cherche à déterminer le centre de masse de la particule et l'obtention des coordonnées de la particule procède de la même manière que lors de l'analyse en post-traitement. La seconde méthode repose sur le calcul du maximum du produit de convolution à partir des moyennes des intensités des pixels de la ROI en x et en y (fig. 26) pour déterminer le centre du colloïde.



Dans les deux cas, il est essentiel de vérifier que les niveaux de gris utilisés ne saturent pas l'appareillage afin que la moyenne des intensités des pixels représente bien une gaussienne avec un pic non écrêté.

Pour les deux méthodes de calcul la ROI est dite mobile, c'est-à-dire qu'elle se déplace avec le colloïde. Elle est fixée sur la première image par l'utilisateur, puis est centrée par le programme sur le couple de coordonnées déterminée à l'image précédente. Ceci permet de travailler avec une ROI petite et toujours centrée sur le colloïde.

L'analyse en temps réel présente l'avantage d'être beaucoup plus rapide que celle en post-traitement. La ROI étant petite cela permet d'exclure la présence de deux jeux de coordonnées pour une seule image (doublet). Enfin les trajectoires obtenues au final ne présentent pas de *trous* puisque lorsque le colloïde devient trop clair, le programme n'est plus capable de le distinguer du fond et l'enregistrement s'arrête.

2.3 – Les colloïdes d'or

2.3.1 – Concentration stabilisatrice

L'observation en suivi de particule unique a été réalisée à l'aide de colloïdes d'or. Les charges négatives qu'ils portent suffisent à empêcher leur agrégation dans l'eau pure. En présence d'ions les colloïdes flocculent, ce qui entraîne un changement de couleur de la suspension, passant ainsi du rose au bleu. Pour empêcher ce phénomène il est nécessaire de recouvrir entièrement les charges des particules. Ce recouvrement sert à stabiliser les colloïdes tout en les rendant spécifiques pour leur utilisation ultérieure. Cette étape est appelée la fonctionnalisation des colloïdes. Dans un premier temps il faut déterminer les concentrations stabilisatrices minimales de chaque protéine utilisée, c'est-à-dire la plus petite concentration permettant de recouvrir entièrement les colloïdes. Pour une concentration de 9.10^{10} colloïdes / mL, les concentrations stabilisatrices obtenues sont de 40 $\mu\text{g/mL}$ pour la BSA, 12 $\mu\text{g/mL}$ pour les anticorps secondaires couplés à la rhodamine et de 4 $\mu\text{g/mL}$ pour les anticorps primaire anti-T7.

2.3.2 – Fonctionnalisation *simple couche* et problèmes rencontrés

L'étape limitante du suivi de particule unique est la fixation sur la molécule d'intérêt qui doit être hautement spécifique. Pour ce faire la liaison entre le colloïde et le récepteur T7-EGFP-hMOR est réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux contre l'étiquette T7. Plus la quantité d'anticorps par colloïde est grande, plus la probabilité de fixation augmente, mais

plus le risque de liaison non spécifique ou de fixation sur plusieurs protéines d'un seul colloïde est augmentée. Il est donc nécessaire d'utiliser une concentration en anticorps la plus faible possible pour la fonctionnalisation des colloïdes, et de vérifier la spécificité de fixation de ces particules sur le récepteur T7-EGFP-hMOR.

La spécificité du marquage est mesurée par comptage du nombre de colloïdes fixés sur les cellules. La fixation non spécifique des colloïdes a été évaluée de deux manières :

- soit par la quantification du nombre de colloïdes fonctionnalisés fixés sur cellules n'exprimant pas T7-EGFP-hMOR,
- soit par la quantification du nombre de colloïdes non fonctionnalisés (stabilisés par de la BSA) fixés sur cellules exprimant T7-EGFP-hMOR.

Dans les deux cas, les colloïdes ne devraient pas être en capacité de se fixer sur les cellules et le taux de marquage devrait être proche de zéro. Ces mesures ont été effectuées sur une centaine de cellules à chaque fois. On obtient ainsi le nombre de colloïdes fixés par cellule de manière non spécifique.

Le nombre de colloïdes fonctionnalisés de manière spécifique fixé par cellule transfectée est également compté et nous donne la fixation totale (spécifique et non spécifique). Le pourcentage de fixation non spécifique est enfin obtenu en faisant le ratio de fixation non spécifique par rapport à la fixation totale.

Dans un premier temps ces mesures ont été effectuées avec le protocole de fonctionnalisation des colloïdes précédemment utilisé dans l'équipe (Daumas, 2002b). Les colloïdes sont fonctionnalisés par incubation avec un mélange de BSA et d'anticorps anti-T7. Différentes concentrations en anticorps T7 ont été testées. Les valeurs obtenues pour les concentrations minimales et maximales utilisées, qui recouvrent entre 1 et 20% de la surface des colloïdes, sont indiquées dans le tableau 4.

[Ac] ($\mu\text{g/mL}$)	Nombre d' anticorps par colloïde	Nombre de colloïdes par cellule	Pourcentage de fixation non spécifique
0,8	35	1,39	20,7
0,04	1,75	0,79	36,4

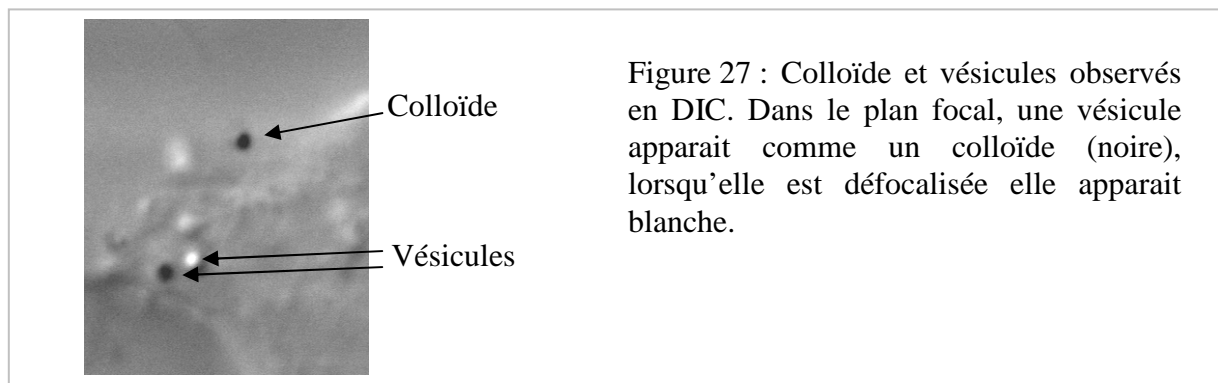
Tableau 4 : Détermination du pourcentage de fixation non spécifique pour différentes concentrations d'anticorps T7 sur cellules transfectées. La concentration de colloïdes est de 9.10^{10} particules / mL.

Le nombre d'anticorps par colloïde est calculé à partir du nombre de colloïdes, de la concentration en anticorps T7, et du nombre d'Avogadro. La valeur indiquée dans le tableau 4 correspond donc au nombre d'anticorps maximum par colloïde.

Ces mesures ont révélé un faible taux de marquage (proche d'un seul colloïde par cellule) en association avec un fort pourcentage de fixation non spécifique, le tout malgré une quantité importante d'anticorps par colloïde. Pour comparaison, lors de l'étude menée précédemment sur T7-hMOR dans les NRK, 9 colloïdes étaient comptabilisés en moyenne par cellule, pour moins de 2 anticorps par colloïde (Daumas, 2003a). Par contre le nombre de colloïdes fixés de manière non spécifique est équivalent à celui obtenu sur les NRK (environ 0,3 colloïde par cellule). Ces valeurs indiquent qu'il n'y a pas une augmentation de marquage non spécifique mais une diminution du marquage spécifique. Outre la différence du système cellulaire utilisé entre ces deux études (SH-SY5Y ou NRK) notre récepteur exprime du côté extérieur, en plus du peptide T7, la EGFP. Les analyses d'immuno-marquage ont permis de vérifier l'accessibilité du peptide T7 aux anticorps, néanmoins nous avons émis l'hypothèse que la EGFP pouvait gêner stériquement l'accès du colloïde recouvert d'anticorps.

2.3.3 – Problème relatif à la présence de vésicules

En plus du faible nombre de colloïdes capables de se fixer spécifiquement sur les cellules, un autre problème s'est présenté, inhérent aux SH-SY5Y. Ces dernières présentent un grand nombre de vésicules qui ressemblent aux colloïdes en contraste de Nomarski. Elles peuvent être différenciées car les vésicules passent brutalement du noir au blanc lorsqu'elles sont défocalisées, alors que les colloïdes disparaissent directement (fig. 27, (De Brabander, 1986)). Néanmoins le nombre de vésicules présentes nécessite une vérification systématique qui perturbe la prise de trajectoires.



2.3.4 – Fonctionnalisation *double couche* et résolution des problèmes

Une nouvelle fonctionnalisation des colloïdes a donc été mise au point afin d'améliorer la fixation spécifique des colloïdes sur les cellules, tout en facilitant la différenciation rapide de ces derniers avec les vésicules.

Les colloïdes sont d'abord entièrement recouverts d'un anticorps secondaire couplé à la rhodamine, puis une quantité minimale d'anticorps anti-T7 est rajoutée pour constituer une seconde *couche*. L'anticorps T7 a été dilué soit dans du tampon Borax (pH 9) soit dans du DMEM* (pH 7).

D'une part cette fonctionnalisation permet d'augmenter la taille du bras reliant le peptide T7 au colloïde de manière à améliorer l'accroche. D'autre part cela permet de visualiser les colloïdes en fluorescence (grâce à la rhodamine) et de les différencier de manière certaine et rapide, des vésicules. La quantification de la liaison de ces colloïdes sur les cellules a également été faite et est indiquée dans le tableau 5 ci-dessous.

[Ac] (µg/mL)	Nombre d' anticorps par colloïde	Nombre de colloïdes par cellule	Pourcentage de fixation non spécifique
Tampon Borax (pH 9)			
0,8	35,0	2,95	3,4
0,4	17,5	2,07	4,8
0,2	8,8	1,22	8,2
DMEM* (pH 7)			
0,4	17,5	3,30	9,1

Tableau 5 : Détermination du pourcentage de fixation non spécifique des colloïdes fonctionnalisés en *double couche* sur les cellules exprimant T7-EGFP-hMOR. Résultats obtenus pour différentes concentrations d'anticorps T7 dilués soit dans du tampon Borax, soit dans du DMEM*. La concentration de colloïdes est de 9.10^{10} particules / mL et la fixation non spécifique a été mesurée grâce à des colloïdes fonctionnalisés spécifiquement comptés sur les cellules sauvages.

Cette nouvelle fonctionnalisation a permis d'améliorer significativement le pourcentage de fixation spécifique. Cette amélioration provient principalement d'une augmentation de la fixation totale alors que la fixation non spécifique reste stable (DMEM*) ou diminue (tampon Borax). Ceci indique bien une augmentation de l'accroche spécifique des colloïdes fonctionnalisés sur le récepteur T7-EGFP-hMOR. Le peptide T7 semble donc plus accessible à ces nouveaux colloïdes. Enfin le recouvrement total des colloïdes par des

anticorps secondaires couplés à la rhodamine permet de les différencier facilement des vésicules, ce qui favorise les comptages.

Le DMEM* a finalement été choisi pour diluer l'anticorps anti-T7. En effet, cela permet une augmentation non négligeable du nombre de colloïdes fixés par cellule, tout en conservant un pourcentage de fixation non-spécifique acceptable.

Des études de diffusion ont donc été entreprises sur les cellules transfectées avec les colloïdes doublement fonctionnalisés à la concentration de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ d'anticorps primaires pour 9.10^{10} colloïdes/mL. Cette concentration a été choisie car elle représente un compromis entre le nombre d'anticorps par colloïde et le nombre de colloïdes par cellule, tout en ayant une bonne spécificité. Les résultats obtenus lors de cette étude ont révélé des valeurs de coefficient de diffusion particulièrement lentes par rapport à celle obtenues en FRAP (cf. chapitre IV) ce qui a soulevé l'existence d'un problème non résolu au niveau de la fixation des colloïdes. La présence d'un glycocalyx a été soupçonnée puis confirmée par les observations en microscopie électronique (cf. chapitre III). L'enzyme choisie pour dégrader le glycocalyx est la neuraminidase dont l'action sera détaillée dans le chapitre suivant. La fixation des colloïdes a été mesurée pour différentes conditions de traitement (concentration, temps) indiquées dans le tableau 6 ci-dessous.

[Neuraminidase] (U)	Temps d'incubation (minutes)	[Ac T7]		
		0,8 $\mu\text{g/mL}$	0,4 $\mu\text{g/mL}$	0,08 $\mu\text{g/mL}$
0,05	15	9,3	2,5	nd
0,05	30	9,2	3,9	1,0
0,05	60	18,0	nd	1,7
0,10	30	nd	nd	2,9

Tableau 6 : Nombre de colloïdes (fonctionnalisés spécifiquement) fixé par cellule (exprimant T7-EGFP-hMOR) en fonction des conditions d'incubation de la neuraminidase et de la concentration en anticorps anti-T7. Le nombre de colloïde fixé de manière non spécifique est de 0,4 par cellule, et la concentration de colloïdes de 9.10^{10} particules/mL. nd : non déterminé

Pour des raisons de morphologie des cellules après le traitement, les conditions retenues pour l'étude dynamique en SPT sont une incubation des cellules avec la neuraminidase à 0,1 U durant 30 minutes à 37°C. Les colloïdes quand à eux sont fonctionnalisés en *double couche*, la première constituée d'anticorps secondaire couplés à la rhodamine (recouvrement à 100 % des colloïdes, soit 12 $\mu\text{g/mL}$), la seconde étant composée

des anticorps anti-T7 à une concentration de 0,08 µg/mL. Dans de telles conditions les colloïdes portent entre 3 et 4 anticorps et près de 3 colloïdes se fixent par cellule, dont 0,4 de manière non spécifique (environ 15 %).

L'adaptation du protocole initial aux cellules exprimant le récepteur T7-EGFP-hMOR a donc permis d'augmenter le taux de fixation des colloïdes (multiplié par 2) tout en diminuant le nombre d'anticorps par colloïde (divisé par 10). Le pourcentage de fixation non spécifique a également légèrement baissé (de 20 à 15 %), et reste raisonnable. Dans le même temps, le coefficient de diffusion des colloïdes a augmenté pour prendre des valeurs cohérentes avec celle obtenues en FRAP. Ces valeurs, ainsi que l'effet du glycocalyx, seront développés dans le chapitre IV traitant de la dynamique du récepteur.

2.4 – Analyse des trajectoires

Une fois les trajectoires obtenues, il est nécessaire de les analyser pour déterminer le type de diffusion que la molécule suit. Le calcul du déplacement quadratique moyen de la molécule en fonction du temps ($MSD_{\delta t}$, pour *mean square displacement*) permet de déduire son mode de diffusion par ajustement avec les équations théoriques. Ces dernières sont connues pour différents modes de diffusion simples. D'autres informations sont apportées par le calcul de la probabilité de confinement en fonction du temps, c'est-à-dire la probabilité que la molécule soit confinée pendant un certain temps. Pour conclure sur la diffusion suivie par la protéine il est important que l'aspect visuel de la trajectoire, le $MSD_{\delta t}$ et le profil de probabilité de confinement soient cohérents entre eux.

2.4.1 – Le déplacement quadratique moyen

→ Calcul

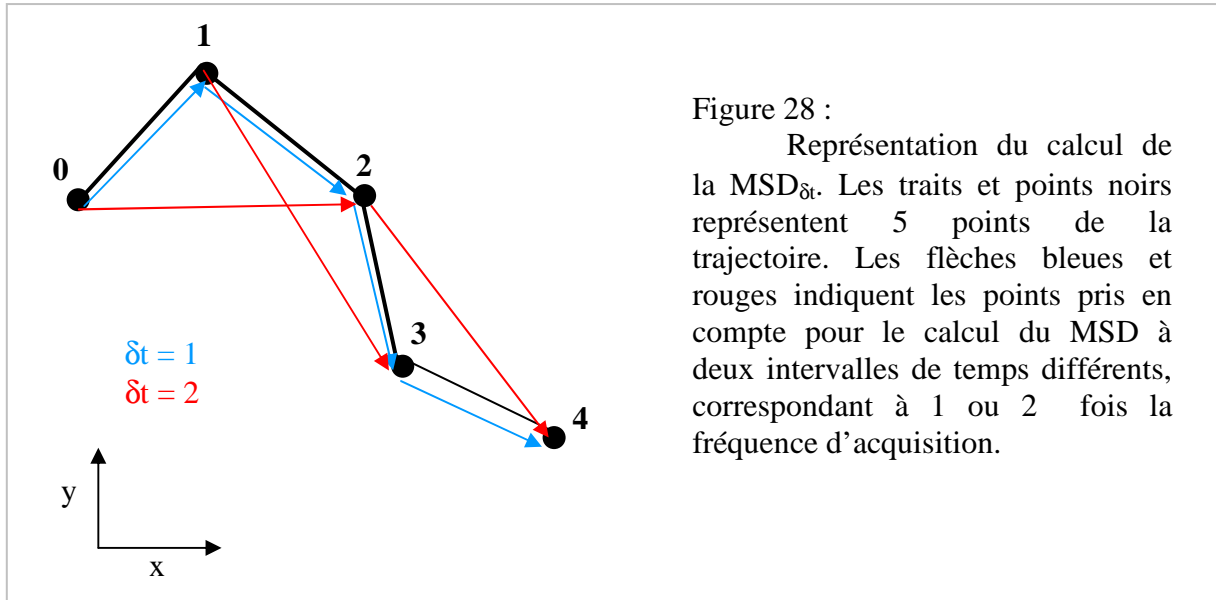
Le déplacement quadratique moyen correspond à l'aire moyenne parcourue par la molécule pendant un intervalle de temps donné. Pour chaque intervalle de temps, il est calculé selon l'équation suivante (Lee, 1991) :

$$MSD_{(\delta t)} = \left\langle (x_{t+\delta t} - x_t)^2 + (y_{t+\delta t} - y_t)^2 \right\rangle \quad (\text{Eq. 16}),$$

où (x_t, y_t) représentent les coordonnées de la molécule à l'instant t , et δt l'intervalle de temps considéré.

Plus l'intervalle de temps δt considéré est long, et moins il y a de points qui rentrent en compte dans le calcul du $MSD_{\delta t}$. Ainsi le bruit expérimental est minimum aux intervalles

courts qui prennent un grand nombre de points en compte. L'intervalle de temps maximum a été fixé au $1/10^{\text{e}}$ du temps total des trajectoires, soit 12 secondes, ce qui est suffisant pour observer les comportements caractéristiques des modes de diffusion détaillés par la suite. La moyenne est réalisée le long de la trajectoire, en glissant, tel que représenté en figure 28.



→ Le D_{1-2}

Ce coefficient de diffusion est calculé à partir des deux premiers points du MSD en fonction du temps. La droite ainsi formée a une pente égale à $4D_{1-2}$, puisqu'aux temps très courts la diffusion de la protéine est brownienne. D_{1-2} reflète l'environnement proche de la molécule suivie et est indépendant du type de diffusion suivi.

→ Différents types de diffusion simples

- Diffusion aléatoire ou brownienne : Il s'agit du mode de diffusion le plus simple. Les molécules ne sont pas limitées dans l'espace, et l'équation du $MSD_{\delta t}$ a uniquement deux paramètres qui sont le coefficient de diffusion D et le temps t ((Lee, 1991) fig. 29, droite noire) :

$$MSD = 4Dt \quad (\text{Eq. 17}).$$

- Diffusion dirigée : Dans ce cas, un terme de déplacement linéaire à longue distance s'ajoute à la diffusion aléatoire. L'équation devient donc (Saxton, 1997) :

$$MSD = 4Dt + v^2t^2 \quad (\text{Eq. 18}),$$

où v représente la vitesse de la molécule. La courbe caractéristique est représentée en rouge sur la figure 29. Ce type de diffusion est généralement rencontré pour les protéines interagissant avec le cytosquelette (Schmidt, 1993).

- Diffusion confinée : Il s'agit de la diffusion suivie par des molécules dont le déplacement est limité dans une zone de la membrane (domaine). Si ces domaines sont clos, l'aire parcourue par la molécule devient fixe à partir d'un intervalle de temps donné, ce qui se traduit par un plateau au niveau de la courbe verte de la figure 29, dont l'équation générique est (Destainville, 2006):

$$MSD = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left(\frac{-12Dt}{L^2}\right) \right) \quad (\text{Eq. 19}),$$

où L est la taille du domaine, relié à son rayon r par la relation :

$$r = \sqrt{\frac{L^2}{3}} \quad (\text{Eq.19bis})$$

R^2 est aussi égal à la valeur du plateau de la courbe (courbe verte, fig. 29).

- Diffusion confinée aux temps courts avec diffusion libre aux temps longs : Aux temps courts cette diffusion correspond à une diffusion confinée, elle s'en différencie aux temps longs car la courbe du MSD en fonction du temps n'atteint pas un plateau (courbe bleue, fig. 29). Ceci est dû à la diffusion à longue distance de la molécule, dont le coefficient de diffusion caractéristique est appelé D_{MACRO} . L'équation (19) devient alors (Destainville, 2006):

$$MSD = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left(\frac{-12D_{micro}t}{L^2}\right) \right) + 4D_{MACRO}t \quad (\text{Eq. 20}).$$

A ces quatre principaux types de diffusion s'ajoutent les cas de déplacement inférieur à la limite de résolution dont nous parlerons plus loin, les molécules étant alors considérées immobiles. De plus les protéines suivies peuvent avoir une diffusion plus complexe au cours du temps, combinant de différentes manières les modes de diffusion simples. C'est pourquoi une analyse plus approfondie est souvent nécessaire.

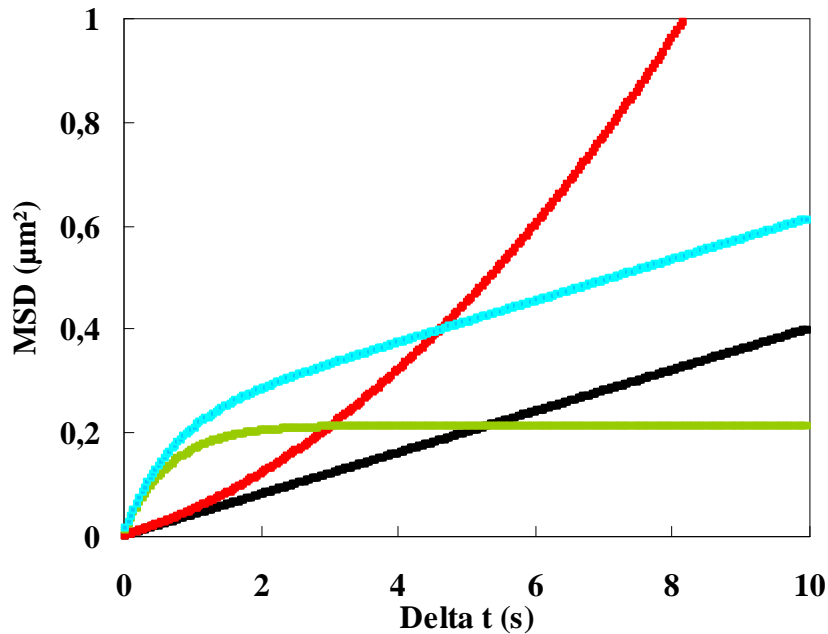


Figure 29 : $MSD_{\delta t}$ simulées pour les différents types de diffusion simple.

Noire : aléatoire, $MSD_{\delta t} = 4Dt$, avec $D = 0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$

Rouge : dirigée, $MSD_{\delta t} = 4Dt + v^2t^2$, avec $D = 0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $v = 0,1 \mu\text{m}/\text{s}$

Verte : confinée, $MSD_{\delta t} = (L^2/3)*(1-e(-12D*t/L^2))$, avec $D = 0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $L = 0,8 \mu\text{m}$

Bleu : confinée avec diffusion à longue distance, $MSD_{\delta t} = (L^2/3)*(1-\exp(-12D_{\text{micro}}*t/L^2)) + 4*D_{\text{MACRO}}*t$, avec $D_{\text{micro}} = 0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $L = 0,8 \mu\text{m}$, $D_{\text{MACRO}} = 0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$

2.4.2 –Détection des zones de confinements

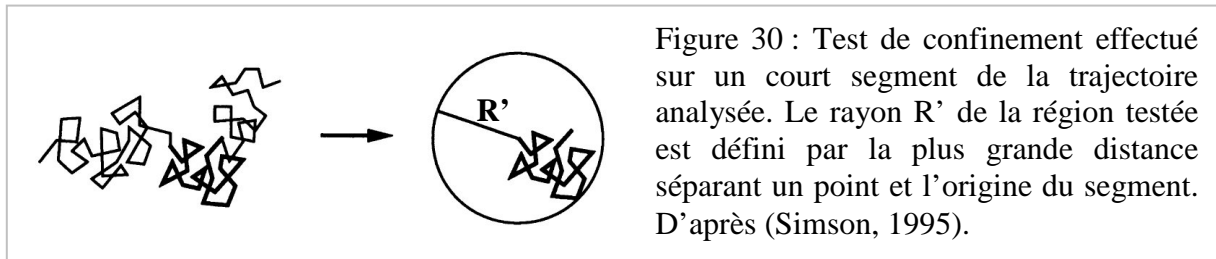
→ Algorithmes de Simson et Saxton

Dans le cas de confinement transitoire au cours de la trajectoire, le $MSD_{\delta t}$ totale ne correspond ni à une diffusion confinée ni à une diffusion aléatoire (Dietrich, 2002; Sheets, 1997). Il est donc particulièrement intéressant de pouvoir détecter des zones de confinements intermittents par une autre méthode. Sur la base des travaux de Saxton (Saxton, 1993) Simson (Simson, 1995) a développé une méthode de détection des zones de confinement transitoire.

A partir de trajectoires aléatoires simulées, Saxton a calculé la probabilité Ψ qu'une particule reste dans un domaine de rayon R' , pendant un temps t pour un coefficient de diffusion D donné :

$$\log \Psi = 0.2048 - 2.5117 \frac{Dt}{R^2} \quad (\text{Eq. 21}).$$

Afin de pouvoir utiliser cet algorithme pour l'étude de trajectoires expérimentales, Simson *et coll.* ont divisé la trajectoire totale en segments plus courts. D est évalué aux temps courts à partir de la $MSD_{\delta t}$ de la trajectoire entière, et R' correspond à la plus grande distance séparant l'origine du segment des autres points du segment (fig. 30).



L'équation 21 est alors appliquée aux segments de la trajectoire ce qui permet de lui attribuer une valeur ψ en chaque point. Cette probabilité est transformée en un index de probabilité de confinement I (appelée L dans la publication de Simson *et coll.*, 1995.). Lorsque ψ est inférieur à 0,1 c'est-à-dire lorsque la molécule a plus de 90% de chance d'être confinée alors on lui attribue un I d'autant plus grand que la valeur de ψ est faible. Au contraire si ψ est supérieur à 0,1 c'est-à-dire si la molécule a moins de 10% de chance d'être confinée, alors I est égal à zéro :

Quand	$\Psi \leq 0,1$	alors	$I = -\log \Psi - 1$
	$\Psi > 0,1$		$I = 0$

Ceci permet de simplifier la lisibilité du graphe I en fonction du temps, puisque les zones aléatoires ont des valeurs de I faibles, alors que les zones confinées présentent des pics de valeurs. Néanmoins une trajectoire aléatoire peut parfois mimer un confinement, c'est pourquoi il est nécessaire de déterminer une valeur seuil I_c au dessus de laquelle les valeurs de I ont seulement 1,5% de probabilité d'être considérées confinées alors qu'elles sont aléatoires. Ce seuil est calculé à partir de trajectoires aléatoires simulées, et dépend de la taille des segments considérés et de l'intervalle entre les points.

→ Modification de l'algorithme

Ce programme a été implémenté dans l'équipe par Laurent Le Guyader. Des modifications importantes ont ensuite été apportées de manière à limiter les artefacts induits.

Ces travaux ont abouti à la formulation d'un nouvel index de confinement par Nicolas Destainville (Laboratoire de Physique théorique, UMR 5152 UPS/CNRS).

La première étape a consisté à adapter l'algorithme au matériel utilisé dans l'équipe. Les valeurs de seuil I_c ont été recalculées pour des tailles de segments glissants de 1 à 12 secondes, avec notre fréquence et notre durée d'enregistrement des trajectoires (25Hz, 120 secondes au lieu de 3 Hz sur 90 secondes). De manière à prendre en compte les variations du coefficient de diffusion au cours du temps, le D_{1-2} utilisé est désormais calculé « à la volée » à partir des MSD de segments glissants (S) de 4 secondes.

De plus, afin de minimiser l'influence de quelques points très extérieurs à la trajectoire, la valeur R' de l'équation 21 qui correspond, dans la méthode de Simson à la distance séparant l'origine des autres points du segment, est remplacée par la variance des distances des points du segment considéré ($\Delta R'^2$). Le nouvel index de confinement Λ , utilisé dans ce travail, est donc le suivant (Meilhac, 2006):

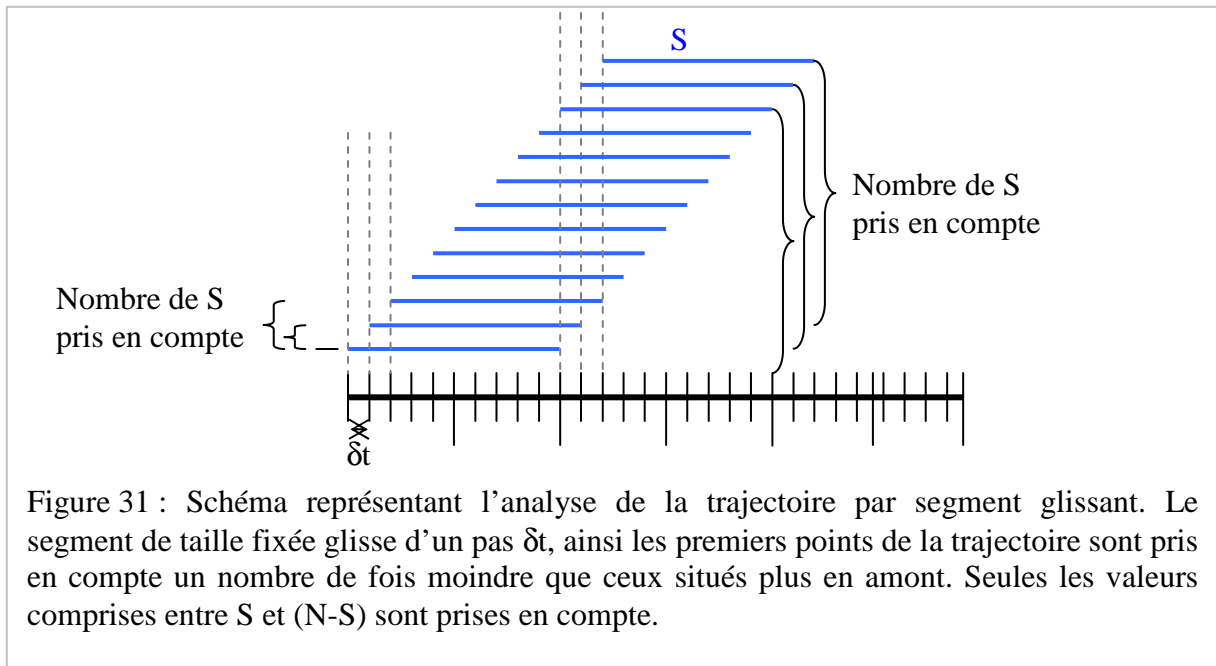
$$\Lambda = \frac{D_{1-2}S}{\Delta R'^2}, \quad (\text{Eq. 22})$$

où S est le segment glissant utilisé pour l'analyse des trajectoires. La valeur seuil Λ_c est calculée égale à 4 (Meilhac, 2006) :

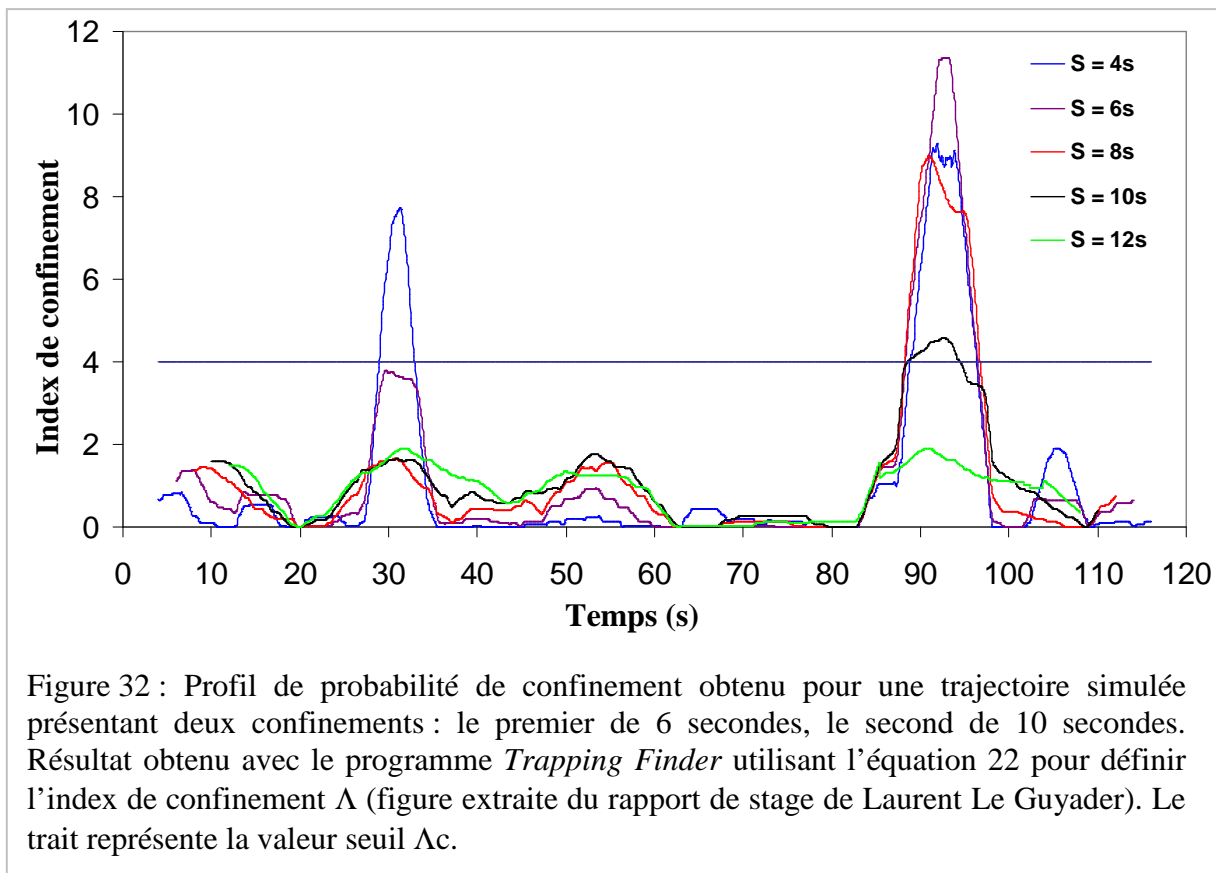
$$\Lambda > 4 \rightarrow \text{confiné}$$

$$\Lambda < 4 \rightarrow \text{aléatoire}$$

Les trajectoires expérimentales sont analysées par segments glissants de taille fixée (S), avec un pas δt égal à l'intervalle de temps entre deux points. Pour chaque S , un point donné rentre donc en compte dans plusieurs calculs, et la valeur de Λ finale correspond à leur moyenne (fig. 31). Les points qui ne sont pas pris en compte dans un nombre suffisant de segments, c'est-à-dire les points de début et de fin de trajectoire, ne sont pas reportés sur le profil de probabilité. Les index de confinement Λ ne sont donc indiqués que pour les points compris entre S et $(N-S)$, où N est le nombre total de points de la trajectoire (fig. 31).



Enfin le profil Λ en fonction du temps est tracé pour chaque valeur de S choisie. Pour qu'une partie de la trajectoire soit considérée comme confinée il est nécessaire que les valeurs de Λ soient supérieures au seuil Λ_c , durant un temps au moins égal à la durée du segment considéré. Ceci permet en plus de déterminer approximativement la durée du confinement (fig. 32).



→ Détection des sauts entre domaines

A partir du profil de probabilité, une analyse plus fine a été menée par Nicolas Destainville et Nicolas Meilhac grâce à des simulations de trajectoires présentant des confinements (Meilhac, 2006). Cette analyse est nécessaire dans le cas d'un confinement présent tout le long de la trajectoire, et dont la $MSD_{\delta t}$ est décrite par un confinement avec une diffusion à longue distance. Le but est de déterminer l'existence de sauts entre des domaines voisins au cours du temps. De tels sauts sont notamment décrits dans le modèle de confinement par le cytosquelette (Kusumi, 1993 ; Suzuki, 2005).

Seules les trajectoires où les deux D calculés à partir de l'ajustement de la $MSD_{\delta t}$ par l'équation 20 respectant le rapport ci-dessous peuvent être traitées :

$$\frac{D_{micro}}{D_{macro}} \geq 20 \quad (\text{Eq. 23})$$

Les sauts sont détectés lorsque le profil de probabilité de confinement passe en dessous d'une valeur seuil pendant un temps supérieur à un temps critique.

Le choix de la valeur seuil et du temps critique sont donc essentiels pour l'efficacité de détection des sauts. Ils peuvent également engendrer des fausses détections. Ainsi, plus le temps critique est court, plus les fluctuations du profil peuvent induire de fausses détections. Ces deux critères ont donc été choisis pour optimiser la détection afin de trouver un maximum de *vrais* sauts et un minimum de *faux* sauts.

La valeur seuil est égale à la moyenne des Λ obtenus sur une durée donnée (20 secondes) multipliée par 0,7. Le temps critique est choisi égal à $S/3$ (Meilhac, 2006). Cette analyse des trajectoires expérimentales obtenues dans ce travail a été réalisée par Nicolas Destainville.

Même si nous ne les avons pas utilisés dans ce travail il faut signaler l'existence d'autres outils d'analyses des trajectoires. Par exemple un index de corrélation de vitesse (*speed correlation index*) qui a récemment été développé par Bouzigues et Dahan permet de détecter des périodes de diffusion dirigée au sein de périodes aléatoires (Bouzigues, 2007). Une autre méthode permettant de discriminer des variations transitoires entre les différents modes simples de diffusion, au cours du temps, a été mise au point dans une autre équipe (Huet, 2006b).

2.4.3 – Résolutions spatiale et temporelle

→ Limites de résolution

La résolution temporelle est fixée par la méthode d'enregistrement, c'est-à-dire la caméra, soit 25 images par seconde dans notre cas. Lors de précédentes études réalisées dans l'équipe, la résolution spatiale a été mesurée de l'ordre de 15 nm pour chaque axe x et y, pour des trajectoires de 2 minutes (Daumas, 2003b). Bien que la chaîne de mesure du SPT n'ait pas changé depuis, le traitement des images a été modifié. Ces valeurs de résolution spatiale ont été conservées pour les séquences d'images qui ont été « post-traitées », la résolution spatiale a été de nouveau mesurée pour les séquences d'images traitées en temps réel.

Elle a été vérifiée par la prise de trajectoires de colloïdes immobilisés dans un gel d'acrylamide. Les écart-types des coordonnées obtenus à partir de 30 colloïdes immobiles par les deux méthodes de détection en temps réel sont indiqués dans le tableau 7 ci-dessous, pour des durées de 5 et 120 secondes.

		Centre de masse	Convolution
120 secondes	Ecart type (x)	15,2	15,6
	Ecart type (y)	14,2	15,5
	<i>Moyenne (x,y)</i>	<i>14,7</i>	<i>15,6</i>
5 secondes	Ecart type (x)	6,2	3,0
	Ecart type (y)	6,3	2,7
	<i>Moyenne (x,y)</i>	<i>6,2</i>	<i>2,8</i>

Tableau 7 : Ecart-types en x et en y obtenus à partir de 30 trajectoires de colloïdes immobiles, par les deux méthodes de détection en temps réel. Toutes les valeurs sont données en nm.

Ainsi des colloïdes immobilisés ont un déplacement apparent d'environ 15 nm sur chaque axe en 2 minutes d'enregistrement, ce qui constitue notre résolution spatiale. Cette valeur est proche quelle que soit la méthode de détection, et est du même ordre que celle obtenue précédemment. On peut noter que la détection par convolution semble plus résolutive sur des temps courts par rapport à la détection du centre de masse.

De plus il est possible à partir de la $MSD_{\delta t}$ de ces trajectoires de déterminer le D_{1-2} minimal accessible. En moyenne, les trajectoires obtenues avec la méthode de détection du centre de masse ont un D_{1-2} de $7,1 \cdot 10^{-5} \pm 1,0 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Celles obtenues avec la méthode de

convolution ont des valeurs un peu plus faibles, égales à $2,4 \cdot 10^{-6} \pm 8,8 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Il apparaît donc que la limite inférieure de coefficient de diffusion accessible est de l'ordre de $10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{s}$.

La limite de détection de la taille des domaines est liée à l'ordonnée à l'origine des $\text{MSD}_{\delta t}$ des colloïdes immobiles. En effet, cette valeur devrait être égale à 0 (aucune surface explorée à $\delta t = \text{zéro}$), or elle est légèrement positive. L'ordonnée à l'origine est en moyenne égale à $2 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2$ (convolution) et $2 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2$ (centre de masse). Cette valeur représente le r^2 dû au bruit (r_b^2) et est égale à $\frac{L_b^2}{3}$, le L bruité (L_b) vaut donc environ 8 nm (convolution) et 20 nm (centre de masse). Afin de s'assurer de la validité de nos mesures, on ne prendra pas en compte les L inférieurs à 40 nm (soit un rayon de domaines de 25 nm).

Néanmoins des trajectoires présentant des L inférieurs à cette limite seront toujours considérées confinées si le profil de probabilité de confinement le confirme. Ainsi seule la taille du confinement ne pourra pas être mesurée.

On peut observer que la méthode d'analyse par convolution est plus précise aux temps courts : écart-types de 5 secondes, D_{1-2} et valeur de l'ordonnée à l'origine de la $\text{MSD}_{\delta t}$. La précision de l'analyse aux temps longs est équivalente pour les deux méthodes. Les données expérimentales ayant été obtenues au fur et à mesure de la mise en place de ces méthodes d'analyse, les résolutions correspondantes ont été appliquées.

→ Critères de reconnaissance des colloïdes immobiles

En plus de déterminer la précision de nos mesures, ces trajectoires nous ont permis de distinguer par la suite les trajectoires immobiles obtenues de manière expérimentale. Plusieurs critères sont caractéristiques (fig. 33).

Dans un premier temps la trajectoire s'étend sur une surface faible ($0,04 \mu\text{m}^2$), ceci en corrélation avec un coefficient de diffusion D_{1-2} de la $\text{MSD}_{\delta t}$ totale faible (inférieur ou proche de la limite de résolution, fig. 33). Il est important que les critères de surface et de coefficient de diffusion faibles soient considérés ensemble, car une surface de déplacement faible peut être en corrélation avec un coefficient de diffusion rapide (confinement).

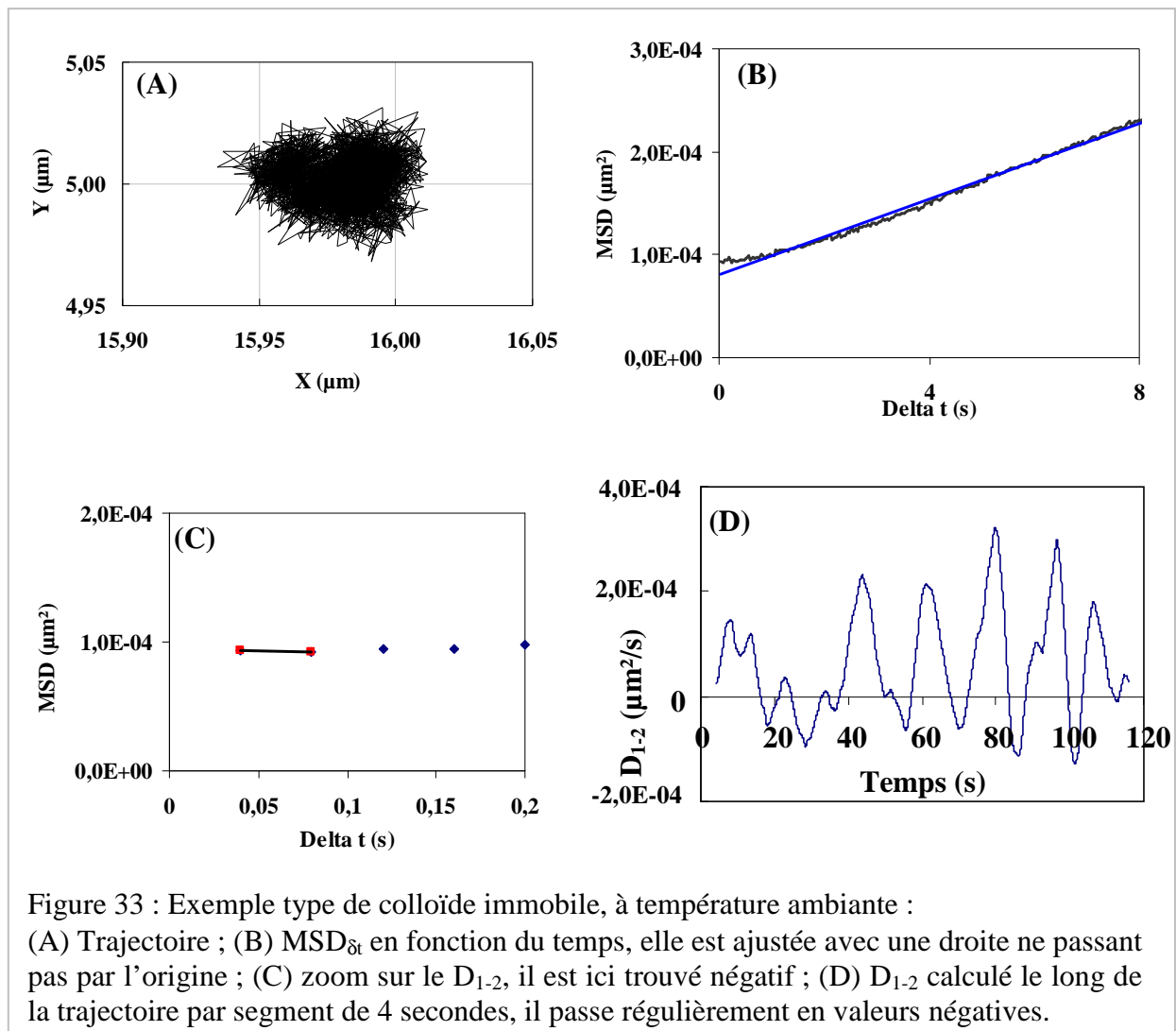
Un second critère de distinction des trajectoires immobiles est l'analyse du D_{1-2} le long de la trajectoire. Cette mesure est faite pour des segments glissants de 4 secondes. Dans le cas

de colloïdes immobiles le D_{1-2} est régulièrement négatif à cause du bruit rencontré sur les premiers points de la $MSD_{\delta t}$ (fig. 33). L'index de probabilité de confinement étant directement relié au D_{1-2} (eq. 22), il fluctue et devient régulièrement négatif.

Enfin la $MSD_{\delta t}$ n'est pas ajustable par une des équations théoriques présentées précédentes mais par :

$$MSD_{\delta t} = 4Dt + \text{Bruit} \quad (\text{Eq. 24})$$

La trajectoire obtenue, ainsi que la $MSD_{\delta t}$, le coefficient de diffusion D_{1-2} de la $MSD_{\delta t}$ totale mais également le long de la trajectoire vont nous permettre de distinguer par la suite les colloïdes expérimentaux immobiles.



Des expériences à 37°C peuvent également être menées. Elles nécessitent d'entourer la platine par une boîte en polystyrène dans laquelle circule un air chaud pulsé. La température est vérifiée en aval et en amont de l'échantillon, par l'intermédiaire d'une sonde. L'écart de température est d'environ 1°C.

Des colloïdes immobilisés ont également été analysés à cette température. Comme attendu les écart-types obtenus sont plus élevés. Ainsi, sur une trajectoire de 120 secondes, il s'élève à 38 nm, et sur 60 secondes à 22 nm. De plus la trajectoire parcourt une plus grande distance et ressemble à une diffusion dirigée, ce qui est confirmé par l'allure de la $MSD_{\delta t}$. Néanmoins, le D_{1-2} mesuré reste faible (environ $3 \cdot 10^{-6} \mu m^2/s$) et prend toujours des valeurs négatives lorsqu'il est analysé le long de la trajectoire. Ce dernier critère devient donc particulièrement important puisque le $MSD_{\delta t}$ ainsi que la trajectoire ressemblent à des trajectoires dirigées.

Nous avons donc vu les principes et les montages des deux techniques utilisées dans ce travail pour l'analyse de la diffusion membranaire de hMOR. Le FRAPrv permet d'obtenir une vue moyenne de l'organisation du récepteur, le SPT vient en complément et permet d'affiner cette analyse et de distinguer la diffusion de récepteurs individuels. La complémentarité de ces deux approches s'est révélée essentielle dans ce travail. Certains paramètres, en particulier le coefficient de diffusion et la taille des domaines, lorsqu'ils existent, sont obtenus par les deux approches et peuvent donc être directement comparés.

Chapitre III

La lignée cellulaire SH-SY5Y surexprimant T7-EGFP-hMOR

Pharmacologie du récepteur

et

caractéristiques des cellules

Le récepteur μ opioïde humain, en fusion avec l'EGFP et un peptide T7, a été exprimé de manière stable dans les cellules SH-SY5Y. Le choix de cette lignée de neuroblastomes sera tout d'abord justifié. L'expression à la membrane du récepteur T7-EGFP-hMOR a été vérifiée, ainsi que sa fonctionnalité, tant au niveau de la fixation des ligands qu'au niveau de la transduction du signal à l'effecteur. Le protocole utilisé par la suite pour bloquer cette transduction du signal par la toxine pertussique a été établi. L'environnement membranaire du récepteur dans les cellules transfectées a été comparé avec celui des cellules sauvages, en particulier au niveau de la composition des membranes. Les structures extra-membranaires : cytosquelette d'actine et glycocalyx ont été caractérisées par imagerie, et les traitements permettant de les perturber mis au point. Pour terminer, les membranes ont été extraites au détergent afin de rechercher l'existence de *detergent resistant membrane*. Le récepteur T7-EGFP-hMOR n'a pas été retrouvé enrichi dans ces domaines particuliers.

1 – La lignée cellulaire : les SH-SY5Y

1.1 – La lignée sauvage

Nous avons vu dans l'introduction que le récepteur μ opioïde est principalement exprimé au niveau du système nerveux central. Afin de conserver ses propriétés fonctionnelles, les cellules les plus pertinentes pour l'expression d'un récepteur chimérique seraient donc les neurones. Néanmoins s'agissant de cellules différenciées, ils ne peuvent être maintenus en culture, ni ne permettent l'établissement d'une lignée transfectée de façon stable.

Afin d'approcher au maximum l'environnement biologique du récepteur, le choix du système d'expression s'est donc porté sur une lignée d'origine neuronale, humaine et cancéreuse : les neuroblastomes SH-SY5Y (ATCC CRL-2266). Les caractéristiques malignes de ces cellules permettent de les transfecter de manière stable, puis de les maintenir en culture pendant plusieurs mois.

Cette lignée est un sous-clone de troisième génération des cellules SK-N-SH, lignée elle-même établie en 1970 à partir d'une métastase de tumeur de moelle épinière humaine. Le dernier sous-clonage a été effectué en 1973 par Biedler, qui en a vérifié les caractéristiques cancéreuses et neuronales (Biedler, 1978). D'autres analyses portant sur la composition en lipides (Liepkalns, 1993 ; Reynolds, 2001) ou en protéines (Klinz, 1987 ; Sadee, 1987 ; Sonnenfeld, 1985) ont également été effectuées, permettant ainsi de mieux définir cette lignée. Il a notamment été démontré la présence de récepteurs aux facteurs de croissance nerveux (Sonnenfeld, 1985), opioïde et muscarinique (Sadee, 1987), ainsi que de différentes sous-unités des protéines G (Klinz, 1987).

Les récepteurs opioïdes endogènes ont été particulièrement étudiés dans ces cellules, révélant la présence majoritaire des formes μ et δ (Kazmi, 1986). Le quatrième récepteur aux opiacés, ORL1, est également exprimé de manière naturelle (Connor, 1996). Les quantités respectives de chaque type de récepteurs sont variables en fonction des publications, mais révèlent toujours une présence plus importante de μ (Kazmi, 1987 ; Yu, 1988). La composition en protéines G a également été recherchée et révèle la présence des sous unités $G_{\alpha i1}$, $G_{\alpha i2}$, $G_{\alpha o}$, $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha z}$ et G_{β} (Ammer, 1994 ; Klinz, 1987). Dans les cellules, le récepteur μ est capable d'inhiber l'adénylate cyclase par l'intermédiaire des protéines G_o inhibitrices, et présente, sur membranes, une seule classe de site de liaison de haute affinité (Carter, 1992,

1993). La présence des sous-unités $G_{\alpha z}$ et $G_{\alpha o}$, qui sont spécifiques des tissus neuronaux, est caractéristique de la nature de ces cellules (Standifer, 1997).

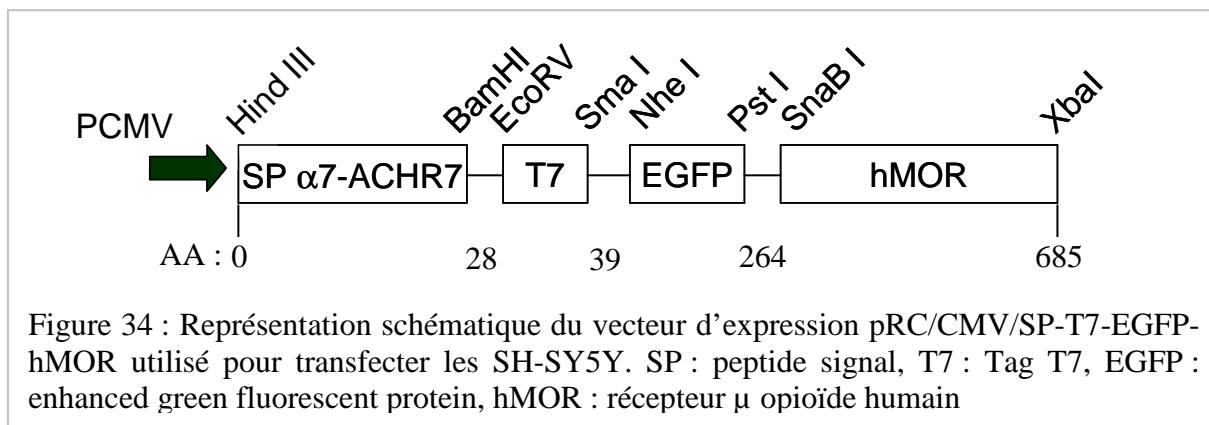
Cette lignée cellulaire présente par ailleurs l'avantage d'être capable de se différencier sous l'action de stimuli particuliers. Divers produits induisant des phénotypes cellulaires légèrement différents, peuvent être utilisés, les plus courants étant l'acide rétinoïque (AR) et le 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA). Cette différenciation entraîne un changement de morphologie des cellules (notamment l'extension de neurites), un changement d'expression protéique ainsi que la mise en place d'activités plus spécifiques des neurones, telle que l'augmentation des concentrations en neurotransmetteurs (Linnala, 1997 ; Pahlman, 1995). Les quantités des sous-unités alpha des protéines G sont également perturbées avec en particulier une augmentation importante de la présence de $G_{\alpha z}$ (Ammer, 1994). Enfin l'expression des récepteurs opioïdes (μ et δ) est également modifiée : l'AR entraîne un doublement de ces récepteurs, tout en conservant le ratio de μ par rapport à δ (Yu, 1990 ; Zadina, 1994). L'augmentation du nombre de récepteurs μ s'effectue sans influencer ses capacités de liaison, tout en entraînant une inhibition plus importante de la production d'AMP cyclique après activation par un agoniste (Ammer, 1994 ; Yu, 1990 ; Yu, 1988).

Toutes ces études mettent en évidence les ressemblances de la lignée SH-SY5Y, différenciée ou non, avec les cellules neuronales natives, et considèrent ce système comme particulièrement pertinent pour l'analyse des mécanismes de transduction du signal par les récepteurs opioïdes.

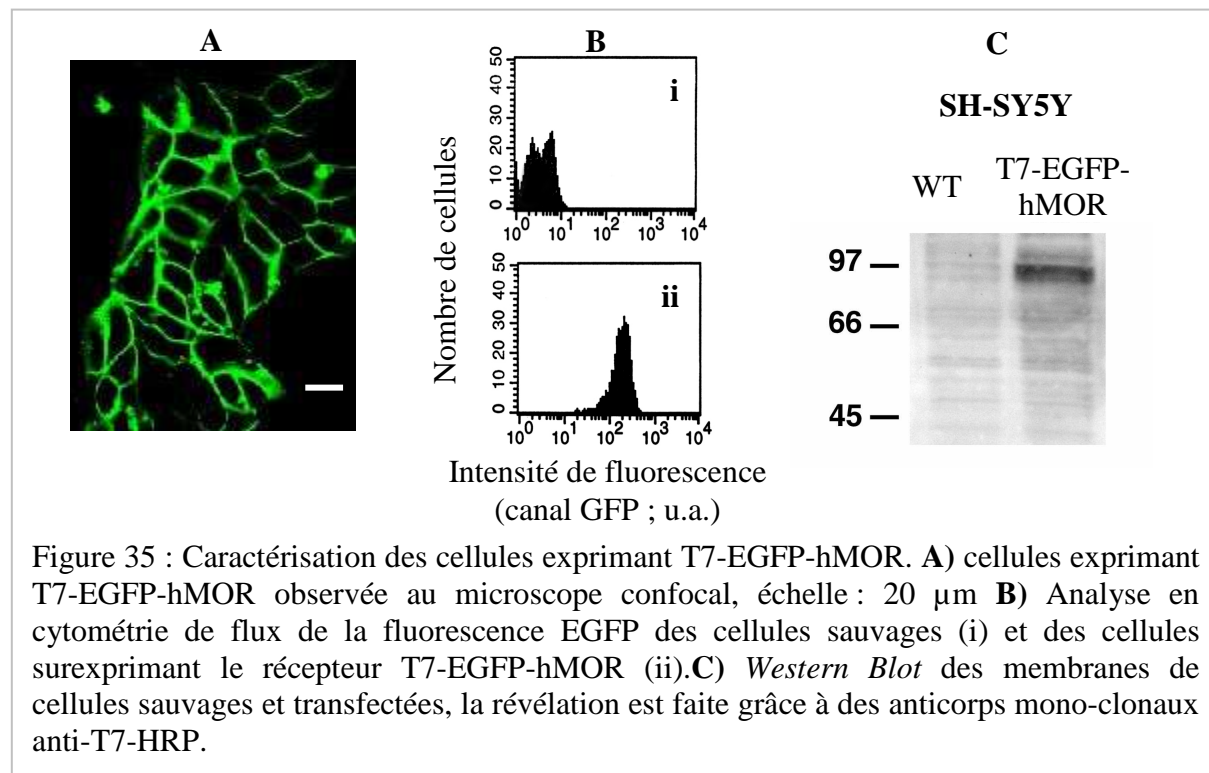
1.2 –La lignée transfectée stable

L'établissement et la caractérisation de cette lignée ont fait l'objet d'une publication ((Sauliere, 2006), cf. annexe). L'analyse biochimique et dynamique décrite dans ce travail de thèse a été réalisée sur le sous-clone 18-6 trié par Claire Millot à partir d'une lignée préalablement transfectée de manière stable par Gérard Gaibelet. L'ADN codant pour le récepteur μ humain en fusion avec l'EGFP, un peptide T7 ainsi qu'un peptide d'adressage membranaire (du récepteur nicotinique) en N-terminal (fig. 34) a été transfecté de manière stable dans les SH-SY5Y. Le peptide signal permet l'adressage membranaire de la protéine de fusion et est clivé après insertion du récepteur dans la membrane. Le peptide T7 permet l'analyse en SPT grâce à la fixation spécifique des colloïdes via des anticorps anti-T7. L'étude

par FRAPrv s'effectue grâce à l'EGFP, fluorophore tout à la fois stable sous faible illumination et photodégradable par une source lumineuse intense (White, 1999).



Dans un premier temps, l'expression à la membrane et l'absence de rétention cytoplasmique du clone choisi (18-6) ont été vérifiées par microscopie de fluorescence (fig. 35A). Les analyses en cytométrie de flux (fig. 35B) ont montré une fluorescence homogène (moyenne et médiane comparables) et environ 50 fois plus intense que celle des cellules témoins sauvages.



Enfin le poids moléculaire du récepteur T7-EGFP-hMOR a été vérifié par Western Blot (fig. 35C). Pour les cellules transfectées uniquement une bande apparaît aux environs de 90 kDa, ce qui est comparable à la valeur attendue (93 kDa dont 27 pour l'EGFP).

L'accessibilité du peptide T7, placé à l'extrémité extérieure du récepteur, a également été vérifiée par marquage avec des anticorps spécifiques.

2 – Tests de fonctionnalité

2.1 – Liaison des ligands

En plus de la localisation membranaire du récepteur, il est essentiel de vérifier sa fonctionnalité : d'une part lors de la liaison du ligand, qui pourrait être perturbée par la présence des étiquettes en N-terminal, d'autre part lors de la transduction du signal par les protéines G jusqu'à l'effecteur. La capacité de liaison du T7-EGFP-hMOR a été préalablement vérifiée dans des cellules COS-M6, transfectées de manière transitoire. Les expériences ont ensuite été effectuées en parallèle sur les lignées sauvage et transfectée, afin de comparer les valeurs obtenues pour le récepteur T7-EGFP-hMOR avec celles du récepteur endogène. L'efficacité de liaison a été testée avec deux agonistes (DAMGO et Morphine) et deux antagonistes (CTAP et Diprénorphine ou DPN) de nature respectivement peptidique et alcaloïdique. Les propriétés de liaison du DAMGO et de la DPN ont été mesurées par liaison directe ; et celles de la morphine et du CTAP par compétition contre la DPN. Nous avons donc obtenu dans le premier cas les constantes de dissociation (K_d) ainsi que le nombre de site de liaison maximum (B_{max}). Dans le second cas ce sont les constantes d'inhibition (K_i) qui sont obtenues. Les résultats sont consignés dans le tableau 8.

Ligands	Paramètres pharmacologiques	hMOR SH-SY5Y	T7-EGFP-hMOR SH-SY5Y	T7-EGFP-hMOR COS-M6
DAMGO	Kd (nM)	2,69 ± 1,67	1,60 ± 0,21	1,30 ± 0,60
	Bmax (pmol/mg prot)	0,02 ± 0,01	0,94 ± 0,14	nd
DPN	Kd (nM)	0,73 ± 0,14	0,33 ± 0,10	0,34 ± 0,16
	Bmax (pmol/mg prot)	0,23 ± 0,02	2,90 ± 0,23	nd
Morphine	Ki (nM)	nd	27 ± 13	18 ± 2
CTAP	Ki (nM)	nd	1,1 ± 0,5	0,9 ± 0,2

Tableau 8 : Paramètres pharmacologiques obtenus pour les quatre ligands testés dans trois lignées : les SH-SY5Y sauvages, les SH-SY5Y transfectées avec T7-EGFP-hMOR et les cellules COS-M6 exprimant T7-EGFP-hMOR.

Les liaisons de la DPN et du DAMGO sont saturables dans la gamme de concentration observée. Les constantes d'inhibition du CTAP et de la Morphine n'ont pas pu être déterminées dans les cellules sauvages à cause de la faible réponse engendrée par la fixation spécifique. Les valeurs de K_d et de K_i obtenues pour les quatre ligands sont similaires dans les différentes lignées cellulaires testées (SH-SY5Ywt – SH-SY5Y transfectée – COS-M6 transfectée) et indiquent une bonne affinité des ligands pour les récepteur endogène et T7-EGFP-hMOR. De plus ces données sont comparables à celle obtenues pour le récepteur μ endogène dans les SH-SY5Y ou dans d'autres systèmes cellulaires (Gaibelet, 1997 ; Kazmi, 1987 ; Law, 2000).

Ces résultats indiquent que la capacité de liaison du récepteur T7-EGFP-hMOR n'est pas modifiée par l'EGFP extracellulaire.

En tant qu'antagoniste, la DPN est capable de se lier au récepteur, que ce dernier soit en haute ou en basse affinité. La liaison maximale obtenue par ce ligand permet donc de déterminer la quantité totale de récepteurs surexprimés (2,90 pmol/mg de protéines), ainsi que le rapport du récepteur exogène avec le récepteur endogène, qui est d'environ un facteur dix (2,90 contre 0,23 pmol/mg de protéines). Puisqu'il s'agit d'un ligand universel, la DPN reconnaît également les récepteurs δ opioïdes présents de manière endogène dans les SH-SY5Y. Compte tenu que ces récepteurs sont moins nombreux que les récepteurs μ endogène, nous pouvons négliger leur effet sur les constantes obtenues ici dans le cas des cellules transfectées.

Dans les cellules transfectées la liaison maximale du DAMGO est plus faible que celle de la DPN d'un facteur 3, ce qui laisse augurer qu'un récepteur transfecté sur trois est en conformation de haute affinité. On peut noter que ce ratio est plus important que celui obtenu sur les membranes de cellules sauvages. Le B_{max} permet de constater une bonne expression à la membrane en quantité suffisante pour les expériences de dynamique.

Ces données ont permis de vérifier la capacité de liaison de différents ligands sur le récepteur transfecté. De manière à se placer en conditions saturantes, les expériences de dynamique réalisées en présence de ligands (chapitre IV, §2) ont été faites à une concentration très supérieure aux constantes déterminées ici, soit 1 μ M.

2.2 – Transmission du signal à l'adénylate cyclase

2.2.1 – Inhibition de l'adénylate cyclase

En plus de l'efficacité de fixation des ligands, il est nécessaire pour s'assurer de la fonctionnalité du récepteur de confirmer le passage du signal du côté intracellulaire, c'est-à-dire de mesurer la réponse de l'effecteur après activation des protéines G. L'activation du récepteur T7-EGFP-hMOR par un agoniste entraîne l'inhibition de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire des protéines $G_{o/i}$ (principalement G_o dans les SH-SY5Y (Carter, 1993)). La diminution du taux d'AMPc, préalablement augmenté par stimulation par la forskoline, permet de déterminer l'inhibition maximale, et la concentration en agoniste nécessaire pour atteindre la moitié de cette inhibition (EC_{50}). Ces deux critères caractérisent l'efficacité de transduction du signal (cf. annexe matériel et méthodes). Compte tenu qu'un récepteur est capable d'activer plusieurs protéines G, qui elles mêmes peuvent activer différents effecteurs (Neubig, 1994), les pourcentages d'inhibition mesurés ne peuvent pas être corrélés à une quantité de récepteurs.

Les deux agonistes inhibent la production d'AMPc de manière concentration-dépendante dans les lignées sauvages et transfectées. L'inhibition maximale atteinte dans la lignée sauvage est de 30 % ($\pm 5\%$) ce qui concorde avec les données connues pour les SH-SY5Y (Kazmi, 1987 ; Carter, 1992), cette valeur atteint 95 % ($\pm 5\%$) dans le cas de la lignée transfectée (fig. 38). Les deux agonistes ont des valeurs comparables d'inhibition maximales et d' EC_{50} (respectivement 0,40 et 2,2 nM pour le DAMGO et la morphine). Ces résultats permettent de confirmer la fonctionnalité du récepteur T7-EGFP-hMOR.

2.2.2 – Effet de la toxine pertussique

Afin d'analyser l'influence des protéines G sur la dynamique du récepteur T7-EGFP-hMOR, il a tout d'abord fallu quantifier les effets d'un agent perturbateur (la toxine pertussique) sur l'inhibition de la production d'AMPc. La toxine pertussique est produite par *Bordetella pertussis* et appartient à la famille des exotoxines bactériennes ayant une fonction d'ADP-ribosylation (Krueger, 1995). Sa structure a été déterminée en 1994 et a confirmé la présence de 6 sous-unités classées en deux domaines : le domaine A, qui porte l'activité catalytique, et le domaine B qui permet la liaison de la toxine sur les membranes (fig. 36, (Stein, 1994)).

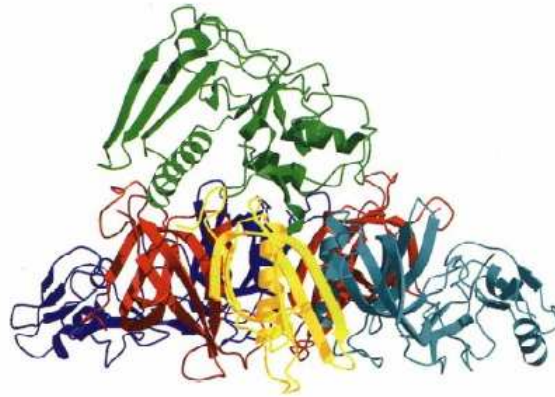


Figure 36 : Structure cristallographique de la toxine pertussique résolue en 1994 par Stein et collaborateurs (Stein, 1994). La sous-unité verte correspond au domaine A catalytique, les 5 autres sous-unités constituent le domaine B de liaison à la membrane.

Après liaison sur la membrane plasmique des cellules, la sous-unité catalytique est introduite dans le cytoplasme par un processus encore inconnu, où elle ajoute un ADP-ribose sur la sous-unité $\alpha_{i/o}$ des protéines G hétérotrimériques. Cette ADP-ribosylation s'effectue au niveau d'une cystéine (fig. 37) située dans l'extrémité N-terminale, qui est également la zone d'interaction avec le récepteur activé. La protéine G ne peut alors plus se fixer au récepteur, déclencher le cycle d'échange GDP/GTP ni la cascade de signalisation (Krueger, 1995 ; Ramdas, 1991 ; Reisine, 1990).

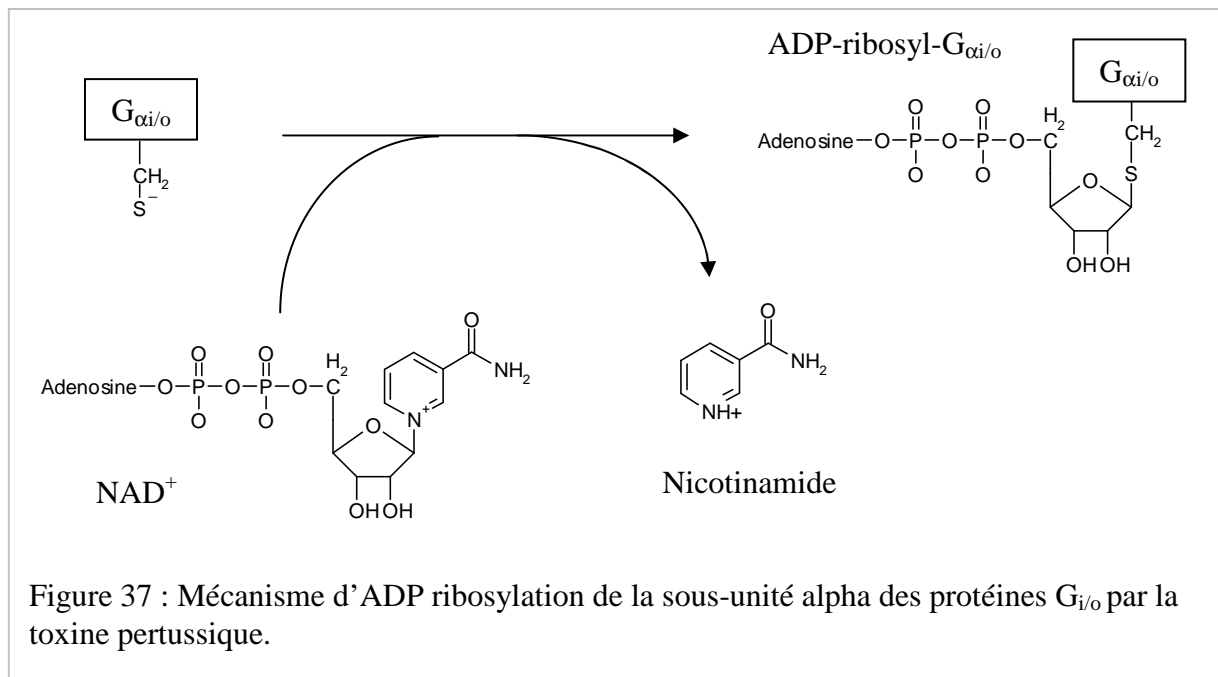
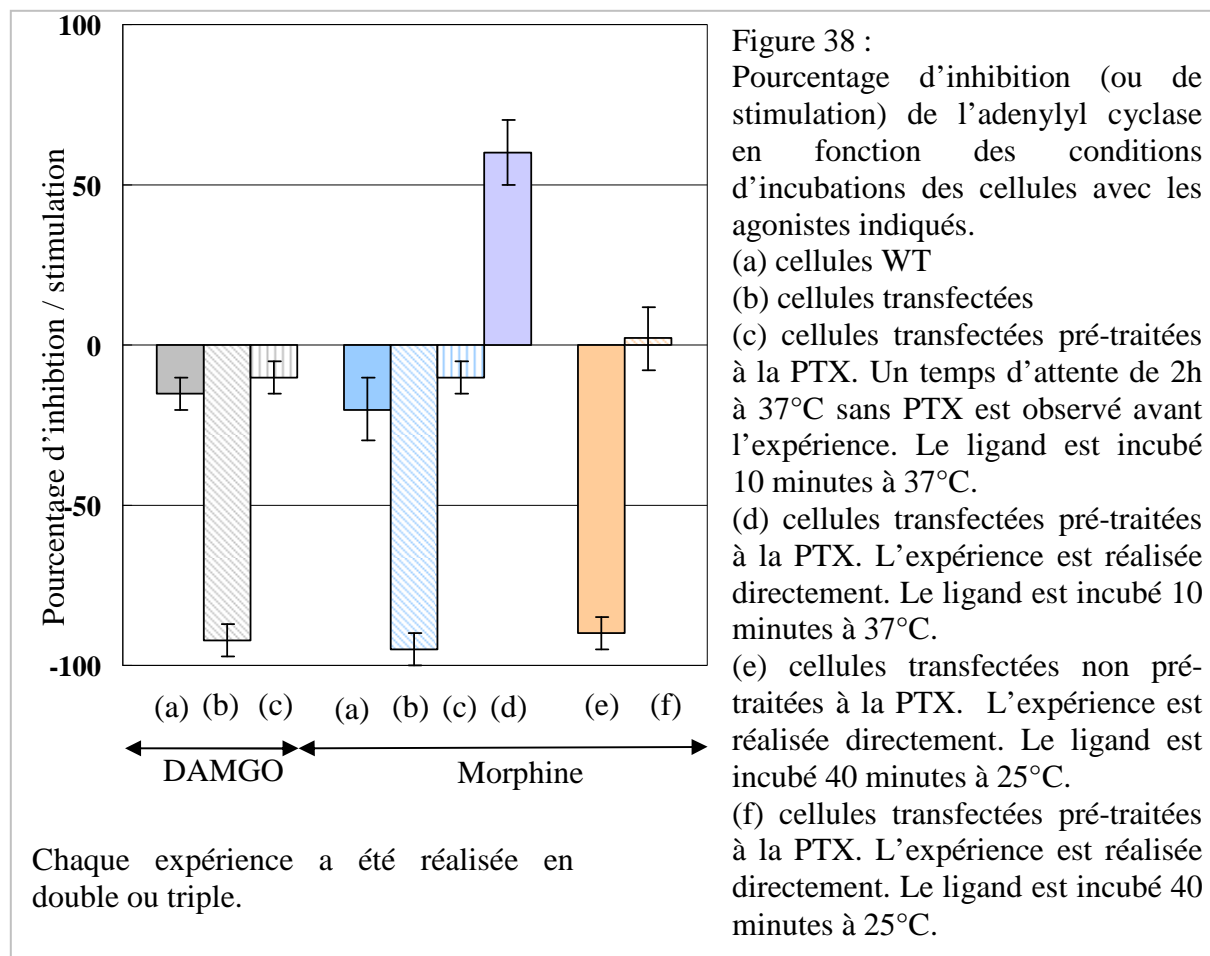


Figure 37 : Mécanisme d'ADP ribosylation de la sous-unité alpha des protéines $G_{i/o}$ par la toxine pertussique.

L'efficacité de la toxine pertussique a été vérifiée par des tests d'inhibition de l'adénylyl cyclase à 37°C et à 22°C, à différents temps d'incubation correspondant aux conditions utilisées par la suite pour les études en FRAPrv (fig. 38). Les cellules, prétraitées ou non à la PTX, sont soumises à l'action d'agonistes, et la production d'AMPc est mesurée. Lorsque les cellules ont été pré-traitées à la PTX et que les mesures se font à 37°C, après 10 minutes de mise en présence avec les agonistes l'adénylyl cyclase n'est plus inhibée. On observe au contraire une augmentation de la production d'AMPc, de l'ordre de 50 %. Ce résultat confirme que la transmission du signal est médiée par des protéines G sensibles à la toxine pertussique (Prather, 1994).

L'étude de la dynamique du récepteur en présence de morphine s'est effectuée après 30 minutes d'incubation à température ambiante. Les tests d'inhibition de l'adénylyl cyclase ont donc été réalisés dans ces conditions, c'est-à-dire 40 minutes d'incubation avec la morphine à 1 µM et à température ambiante. Les 40 minutes correspondent au temps d'incubation choisi (30 minutes) plus 10 minutes pour se placer environ à la moitié du temps d'observation des cellules en FRAPrv. Dans ce cas l'adénylyl cyclase est activé par la forskoline pendant 10 minutes avant ajout de la morphine afin de ne pas laisser les cellules trop longtemps en contact avec cet activateur. L'inhibition pour les cellules non traitées à la toxine est de l'ordre de 85 % et celle obtenue pour les cellules traitées à la toxine pertussique est proche de zéro (fig. 38).

Ces résultats indiquent que les protéines G sont toujours ADP-ribosylées après 40 minutes à température ambiante, en absence de PTX, et ne sont pas capables de transmettre le signal du récepteur à l'adénylyl cyclase.

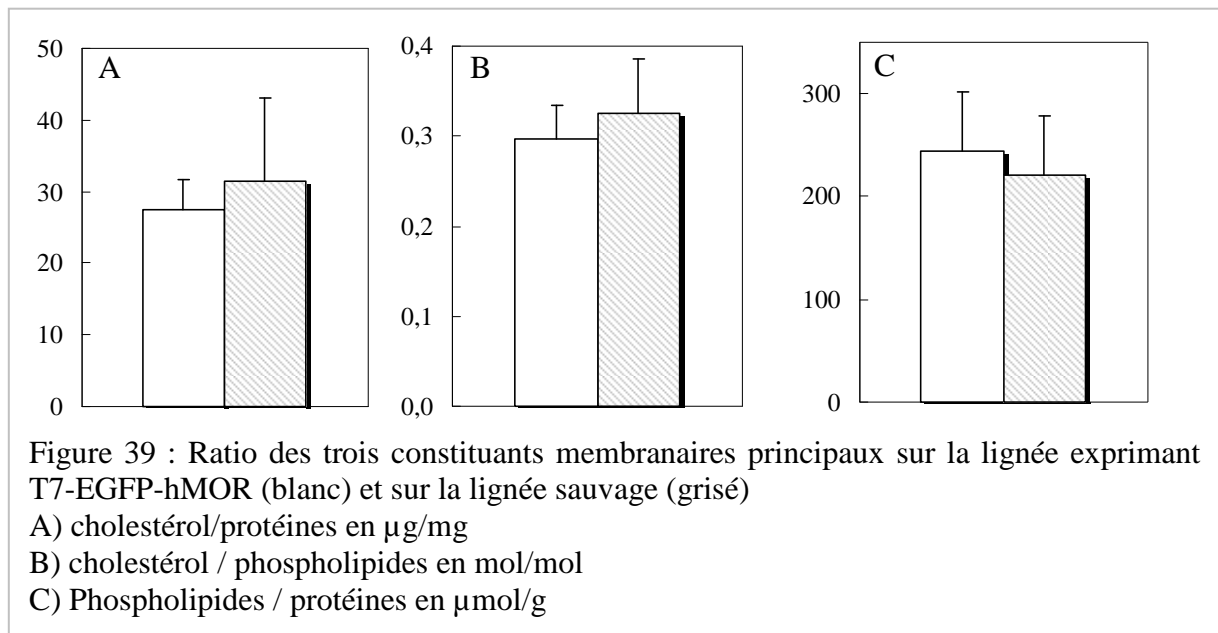


L'internalisation des récepteurs sous l'effet des agonistes a également été observée sur cellules prétraitées à la toxine pertussique. Il apparaît que l'inhibition de la liaison des protéines G sur le récepteur n'empêche en rien l'internalisation de ce dernier après fixation de l'un ou l'autre des agonistes. La cinétique de ce phénomène n'est également pas modifiée. Plusieurs voies d'activation des GRK conduisant à la phosphorylation des récepteurs existent, ou sont supposées. Ainsi, la montée à la membrane de GRK2 est favorisée par le dimère $\beta\gamma$ (Pierce, 2002 ; Pitcher, 1998), ou bien son activité peut être modulée par l'intermédiaire de la PKA (protéine kinase A, (Cong, 2001)). Ces deux voies impliquent l'activation et la dissociation préliminaire de l'hétéro-protéine G, qui ne semble pas être impliquée dans notre système.

En effet, nos résultats vont dans le sens de deux voies bien séparées entre la transduction du signal par les protéines G d'une part, et l'internalisation du récepteur via la phosphorylation, les arrestines et les puits de clathrine d'autre part. Une telle dissociation entre la signalisation et l'endocytose a également été proposée pour le récepteur MOR murin exprimé dans des HEK 293 (Whistler, 1999).

3 – Environnement lipidique

Afin de vérifier que la composition de la membrane plasmique n'a pas été perturbée par la transfection, la composition des membranes de cellules sauvages ou transfectées a été déterminée. Différents critères ont été pris en compte : les ratios entre les trois constituants principaux (protéines, cholestérol, phospholipides), la proportion des différentes têtes polaires et la longueur des chaînes d'acides gras des phospholipides. Ces analyses ont été effectuées en parallèle sur les cellules SH-SY5Y transfectées juste après décongélation, ou après 3 mois de culture, afin de rechercher une éventuelle dérive liée à la conservation de la lignée en culture. Aucune différence significative en fonction de l'âge des cellules n'ayant été observée, les résultats présentés ci-dessous correspondent aux moyennes globales. Les ratios des trois constituants principaux de la membrane, pour les deux lignées, sont représentés en figure 39.



La transfection n'a pas modifié les proportions relatives de cholestérol, protéines et phospholipides. Le cholestérol représente environ 30 % des phospholipides (en mol/mol) ce qui est la valeur classique trouvée pour les membranes cellulaires (Shechter, 2004). Il est à noter que le protocole d'obtention des membranes utilisé ici ne sépare pas complètement la membrane plasmique de celle des organelles. Seul le noyau est éliminé par centrifugation, ainsi que des parties du réticulum endoplasmique et du golgi (Dupou, 1987a).

Les quantités relatives des différentes têtes polaires des phospholipides membranaires (moyenne de 5 échantillons) sont représentées en figure 40. La différence la plus importante

se situe au niveau de la phosphatidylethanolamine (PE) mais cette variation ne peut pas être considérée comme étant significative. En effet l'examen des valeurs individuelles indique que cette différence est principalement causée par un échantillon transfecté, ne contenant que très peu de PE, et un seul échantillon sauvage qui en contient beaucoup plus.

Les acides gras coiffés d'une phosphatidylcholine (PC) sont majoritaires (de 35 à 45 %), devant les PE (de 15 à 25 %), puis la sphingomyeline (SM), les phosphatidylinositol (PI) et phosphatidylserine (PS, près de 10 % chacun). Un dernier composant phosphoré est présent, représenté par les barres X. Il peut s'agir de lyso-phospholipides, c'est-à-dire des lipides qui auraient été dégradés lors des différentes étapes, ou bien peut-être d'un phospholipide exotique. Cette question n'a pas été poussée plus avant, les quantités relatives de chaque tête polaire, et de ce composé, étant comparables d'une lignée à l'autre. De plus, pour chaque glycérophospholipide, ces valeurs sont cohérentes avec la composition détaillée de la lignée (Liepkalns, 1993).

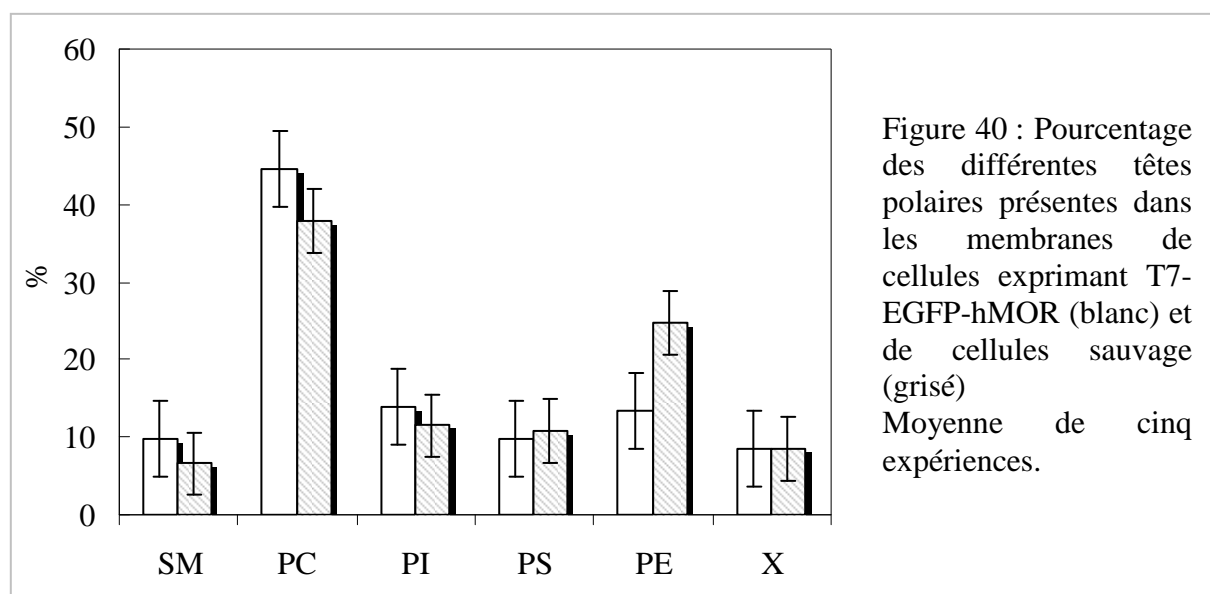


Figure 40 : Pourcentage des différentes têtes polaires présentes dans les membranes de cellules exprimant T7-EGFP-hMOR (blanc) et de cellules sauvage (grisé) Moyenne de cinq expériences.

Enfin les longueurs des chaînes d'acides gras ont été analysées par chromatographie gazeuse. Les compositions entre les deux lignées sont équivalentes (tableau 9), avec une majorité de $C_{16:0}$, puis de $C_{18:0}$ et enfin de $C_{18:4}$.

Les quantités de $C_{20:4}$ et $C_{20:1}$ ne sont pas non plus négligeables. Le premier de ces acides gras est connu pour être présent dans les cellules de type neuronal. On retrouve généralement une autre chaîne grasse longue et insaturée : le $C_{22:6}$, qui n'est pas mesurée ici. Il est possible que les conditions d'extraction, et le conditionnement des lipides séchés, n'empêchent pas l'oxydation de ces chaînes, conduisant à leur non-observation. De plus, les

analyses menées par Reynolds (Reynolds, 2001) qui a obtenu un pourcentage plus élevé de ces acides gras poly-insaturés, ont été faites sur des membranes de SH-SY5Y différenciées. Il est possible que la composition membranaire varie au cours de cet événement.

	SH-SY5Y ^{T7GFP^{hMOR}}	SH-SY5Y ^{hMOR}
C14:1	1,6 +/- 0,2	1,2 +/- 0,2
C16:2	0,8 +/- 0,1	0,8 +/- 0,1
C16:0	31,7 +/- 5,9	34,4 +/- 3,6
C18:4	15,3 +/- 6,7	15,1 +/- 4,9
C18:2	3,1 +/- 0,9	3,9 +/- 0,2
C18:1	5,4 +/- 1,9	2,9 +/- 0,8
C18:0	20,8 +/- 12,1	25,9 +/- 7,9
C20:4	13,4 +/- 2,0	9,1 +/- 1,2
C20:1	6,4 +/- 1,5	6,5 +/- 3,0

Tableau 9 : Pourcentage relatif des différentes chaînes d'acides gras présentes dans les membranes de cellules sauvages et transfectées. Moyenne de cinq expériences.

L'analyse de la composition de la membrane et de la proportion de chaque constituant, a révélé que la transfection n'avait pas modifié la composition membranaire des SH-SY5Y. Enfin nous avons vérifié que les cellules étaient toujours capables d'intégrer des lipides exogènes par simple mise en présence dans le milieu de culture. Le lipide choisi (DiC_{12:0}-PE-rhodamine) est marqué sur la tête polaire par un groupement rhodamine, de manière à limiter le flip-flop, et à distinguer la fluorescence des lipides insérés de celle des récepteurs EGFP. Les lipides s'insèrent rapidement dans la membrane plasmique des cellules, et ne sont pas internalisés après 30 minutes à température ambiante (fig. 41).

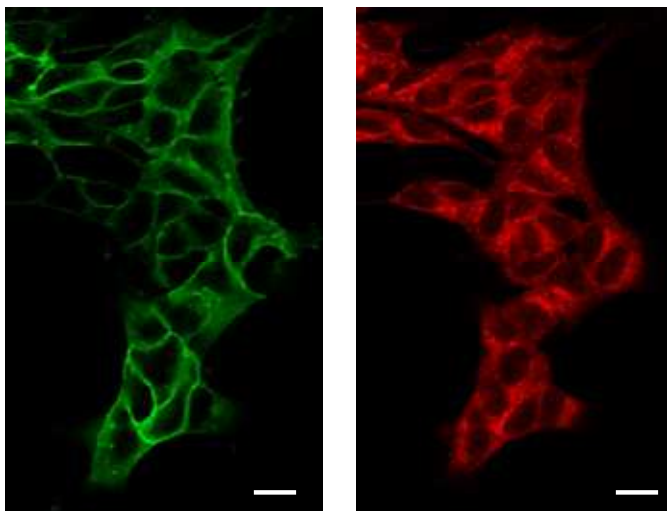


Figure 41 : Visualisation en microscopie de fluorescence des cellules exprimant T7-EGFP-hMOR et après insertion de lipides DiC_{12:0}-PE-rhodamine. La fluorescence de l'EGFP colocalise au niveau membranaire avec celle des lipides rhodamine. Images réalisées au microscope confocal. L'échelle représente 20 µm.

4 – Internalisation due aux ligands

4.1 – Littérature

La fixation d'agonistes sur le récepteur entraîne, en plus de la transduction du signal, l'internalisation plus ou moins efficace du récepteur. Les deux agonistes testés (DAMGO et Morphine) sont capables de se lier au récepteur et d'entraîner une réponse de l'adénylyl cyclase (effecteur secondaire). La morphine est décrite pour ne pas induire d'internalisation mais au contraire peut entraîner une tolérance ou une dépendance (Keith, 1996 ; Whistler, 1998). Le DAMGO (ainsi que les agonistes endogènes tel que l'etorphine) entraîne la relocalisation du récepteur μ dans les puits de clathrine de manière efficace, suivie de l'endocytose (Minnis, 2003 ; Sternini, 1996).

L'origine de la différence d'efficacité de ces deux agonistes, au niveau de l'endocytose, reste sujette à discussion. Une étude menée sur hMOR, surexprimé dans des HEK293, a montré l'incapacité de la morphine à entraîner son endocytose. Néanmoins, la co-transfection avec la GRK2 (kinase des récepteurs couplés aux protéines G spécifique du récepteur μ opioïde) entraîne l'internalisation de la moitié des récepteurs après 1 h d'incubation avec 10 μ M de morphine, à 37°C (von Zastrow, 2003 ; Zhang, 1998). Il semble donc que la morphine induise une internalisation moindre du récepteur (plus lente et moins efficace) que celle induite par d'autres agonistes, tel le DAMGO. Cette internalisation est observée, ou non, en fonction du type cellulaire, et des conditions d'incubation (Dang, 2005).

La phosphorylation du récepteur joue un rôle essentiel dans sa désensibilisation (Hasbi, 1998) et semble donc être l'étape qui différencie les effets des différents agonistes. La phosphorylation plus ou moins efficace du récepteur serait due à une accessibilité différente de sa queue C-terminale en fonction du changement de conformation de hMOR, consécutif à la fixation de l'agoniste. La phosphorylation des récepteurs étant nécessaire à la fixation des arrestines, une phosphorylation limitée entraîne une internalisation moindre (Whistler, 1999). Le niveau de phosphorylation ne modifie pas la liaison aux protéines G, ni la transduction du signal qui s'effectue donc correctement (Whistler, 1998). Les effets de dépendance et de tolérance rencontrés lors de traitements chroniques aux agonistes exogènes (morphine, méthadone) semblent être liés à une phosphorylation faible des récepteurs et à une faible endocytose (Yu, 1997).

De manière générale, les antagonistes sont connus pour n'entraîner ni transduction du signal par les protéines G, ni internalisation. Néanmoins des exceptions ont été observées, où

une liaison de l'antagoniste induit l'internalisation du récepteur sans transduction du signal. C'est par exemple le cas du récepteur à la cholecystokine (Roettger, 1997) ou celui du neuropeptide Y (Pheng, 2003). Les mécanismes qui rentrent en jeu lors de cette endocytose ne sont pas les mêmes que pour l'internalisation via les agonistes (Pheng, 2003 ; Roettger, 1997). De tels résultats ne sont pas décrits pour le récepteur μ .

L'internalisation d'un récepteur par un ligand dépend donc du ligand lui-même, mais également du système cellulaire et des conditions d'incubation. Afin de tester l'efficacité d'internalisation par les quatre ligands choisis, des observations en microscopie de fluorescence ont donc été effectuées. Il est essentiel pour l'étude en dynamique (FRAPrv) que le ligand n'entraîne pas d'internalisation afin de maintenir le récepteur à la membrane.

4.2 – Résultats

L'internalisation du récepteur T7-EGFP-hMOR par le DAMGO s'est révélée particulièrement efficace dans les SH-SY5Y. En effet dès 15 minutes d'incubation, en concentration saturante (1 μ M) et à température ambiante, des points très fluorescents apparaissent à la membrane. Ces vésicules envahissent l'ensemble du cytoplasme en 30 minutes, laissant les membranes encore visibles mais moins fluorescentes (fig. 42C). A température physiologique cette internalisation est plus rapide, la présence de nombreuses vésicules fluorescentes dans le cytoplasme étant observée dès 5 minutes d'incubation à la même concentration. Une cinétique du même ordre (quelques minutes à 37°C) est observée pour le MOR activé par le DAMGO dans des neurones (Minnis, 2003).

Les premières conditions d'incubation testées pour la morphine, identiques à celles du DAMGO, n'induisent pas l'internalisation du récepteur. Même après une heure d'incubation, en concentration saturante et à température ambiante, aucune fluorescence n'est visible dans le cytoplasme et les cellules sont toujours délimitées par des membranes fluorescentes. Des conditions d'incubation plus drastiques ont donc été testées. L'incubation des cellules en présence de morphine pendant 30 minutes à température physiologique a permis de distinguer une ponctuation fluorescente sous-membranaire, qui au bout d'une heure à cette même température, aboutit à la présence de nombreuses vésicules dans le cytoplasme. Un tel résultat est cohérent avec des résultats obtenus dans les cellules SH-SY5Y (Horner, 2004), ou bien dans les HEK293 co-transfectées avec la GRK2 (Zhang, 1998).

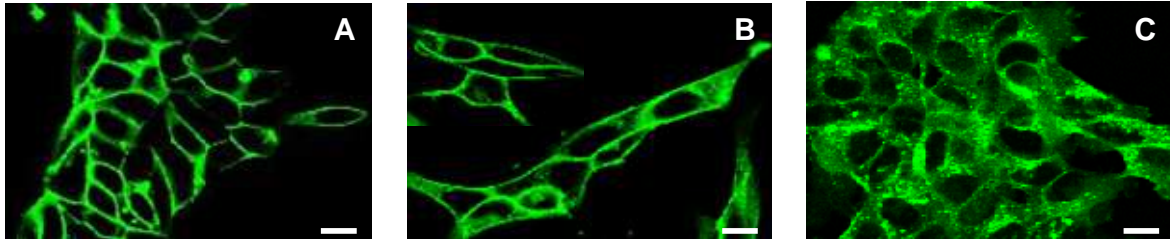


Figure 42 : Cellules SH-SY5Y exprimant T7-EGFP-hMOR observée au microscope de fluorescence après ajout de différents ligands.
 (A) A l'état basal, après 30 minutes à 22°C,
 (B) Après 30 minutes d'incubation à 22°C avec l'antagoniste CTAP,
 (C) Après 30 minutes d'incubation à 22°C avec l'agoniste DAMGO.
 L'échelle représente 20 μm.

Ces résultats démontrent d'une part le bon fonctionnement de la machinerie d'internalisation (reconnaissance des récepteurs et formation des vésicules) et d'autre part les comportements distincts, en termes de cinétique, des deux agonistes testés. L'internalisation efficace par la morphine, qui n'est pas toujours retrouvée lors de l'expression de hMOR dans d'autres lignées cellulaires, reflète la présence dans les SH-SY5Y de toute la machinerie protéique (notamment les GRK2) nécessaire à la régulation des récepteurs.

L'effet des antagonistes (CTAP et DPN) a également été observé. Ces derniers n'entraînent pas d'internalisation de T7-EGFP-hMOR, quelles que soient les conditions d'incubation testées (fig. 42B).

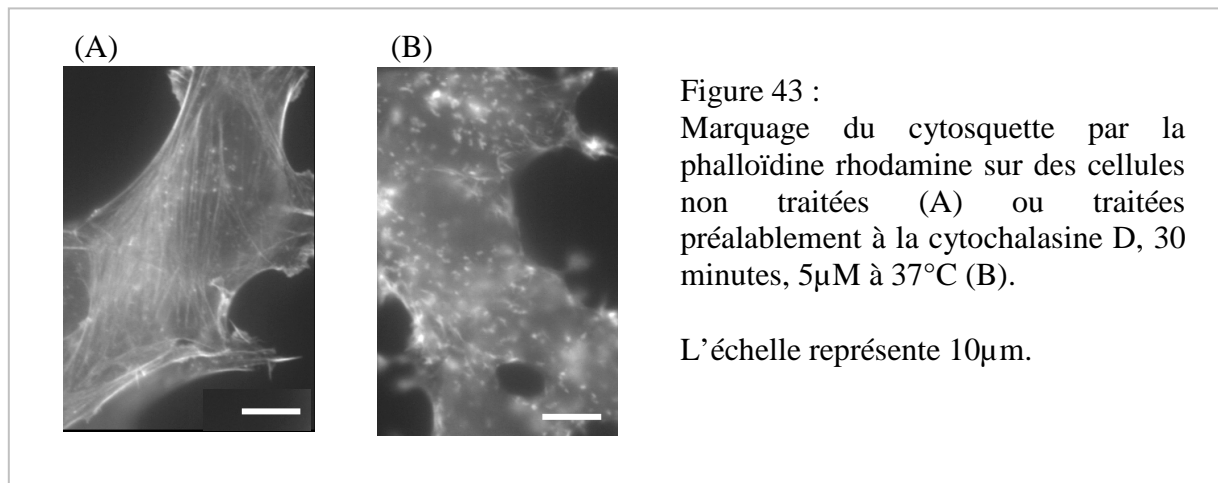
5 – Le cytosquelette

Nous avons vu dans l'introduction l'importance du cytosquelette dans la dynamique des constituants membranaire. Nous avons donc voulu tester l'effet de la perturbation du cytosquelette d'actine sous-membranaire sur la diffusion de T7-EGFP-hMOR. Il a donc tout d'abord fallu mettre au point les conditions de destruction des filaments d'actine.

La cytochalasine D (CD) utilisée ici, est une des drogues les plus efficaces permettant de dépolymériser les filaments d'actine (Flanagan, 1980). Elle est spécifique de la forme *F* de l'actine, *in vitro* elle a des constantes de fixation et d'inhibition de l'ordre du nM, soit une efficacité dix fois plus grande que les autres cytochalasine (B et E). Sa fixation sur l'extrémité polymérisante des filaments (sites de haute affinité) empêche l'ajout de nouveaux monomères d'actine. La dépolymérisation qui se poursuit à l'autre extrémité du filament conduit à sa destruction (Cooper, 1987 ; Goddette, 1986). Cette drogue a en outre l'avantage de traverser

la membrane plasmique, ce qui permet son utilisation avant une étude en dynamique sur cellules vivantes (Flanagan, 1980).

Le marquage du cytosquelette est fait grâce à une toxine fongique (phalloïdine) marquée à la rhodamine, qui reconnaît spécifiquement l'actine (forme filamenteuse et monomérique). Néanmoins elle ne peut traverser la membrane plasmique ; les observations ont donc été faites sur cellules fixées, après perméabilisation de la membrane. Les images obtenues (fig. 43A) montrent la présence d'un cytosquelette important ; l'actine est majoritairement présente sous forme de filaments, mais également sous forme monomérique dans le cytoplasme. Ces images correspondent à ce qui était attendu pour des cellules d'origine neuronales, et observé précédemment (Leventhal, 1997).



Dans les cellules, la destruction du cytosquelette dépend de la concentration de cytochalasine D utilisée. La différence de K_d trouvée *in vitro* (2 nM) et *in vivo* (200 nM) est probablement due à l'existence dans les cellules de protéines de capping sur les filaments (Wakatsuki, 2001). L'association de la CD avec les filaments d'actine met alors en jeu une compétition avec les protéines de capping, les concentrations nécessaires pour dépolymériser les filaments sont donc plus importantes *in vivo*, et probablement variables d'un type cellulaire à l'autre. De plus, *in vivo*, les concentrations utilisées, de l'ordre du µM, permettent à la CD de se fixer également aux dimères d'actine, favorisant ainsi la présence d'agrégats dans le cytoplasme, qui ne peuvent donc pas participer à la formation des filaments (Goddette, 1986 ; Wakatsuki, 2001).

La destruction du cytosquelette des cellules surexprimant T7-EGFP-hMOR par la CD est illustrée en figure 43B. On observe une plus grande présence d'agrégats dans le

cytoplasme correspondant à de l'actine non filamenteuse. De plus il reste beaucoup moins de filaments d'actine. De ce fait il est probable que le cytosquelette ne soit pas détruit complètement. Des tests effectués à une concentration double de CD (10 μM) ont confirmé cette hypothèse car aucun filament n'est cette fois distinguable. Néanmoins cette condition n'a pas été choisie car elle entraîne un changement de morphologie accompagné d'un décollement des cellules, ce qui confirme la destruction massive du cytosquelette sous-membranaire.

Les analyses de la diffusion des récepteurs ont donc été réalisées après incubation avec la CD pendant 30 minutes, à 5 μM , à 37°C. Le système cellulaire utilisé lors de ce travail présente donc un cytosquelette important, constitué de nombreuses fibres d'actine et qui peut être (partiellement) détruit par la cytochalasine D. La présence et les conditions de destruction des microtubules n'ont pas été recherchées.

L'effet des ligands sur l'internalisation des récepteurs, dans les cellules dont le cytosquelette a été détruit a été recherché. L'endocytose des récepteurs par les agonistes ne semble pas modifiée par la destruction du cytosquelette dans les conditions choisies (fig. 44). Elle est toujours présente et la cinétique d'internalisation n'a pas été mesurée précisément pour distinguer un ralentissement faible.

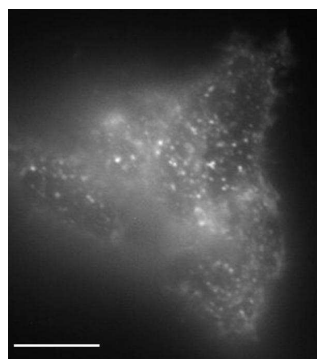
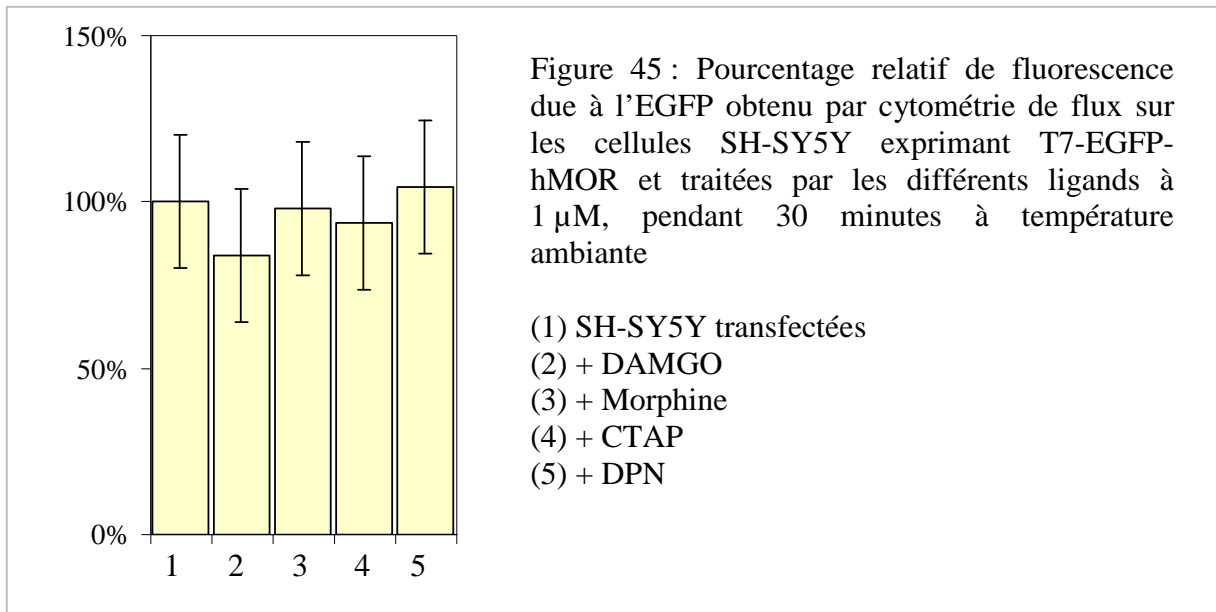


Figure. 44 : Effet du DAMGO sur l'internalisation de T7-GFP-hMOR après traitement à la CD. Cellules SH-SY5Y exprimant T7-GFP-hMOR observées après 30 minutes d'incubation avec la cytochalasine D, 5 μM à 37°C, puis incubation avec l'agoniste DAMGO, 10 minutes à 1 μM , à 37°C. L'échelle représente 10 μm .

6 – Fluorescence totale des cellules et survie cellulaire

Des analyses en cytométrie de flux ont été réalisées afin de quantifier la fluorescence totale des cellules due à l'EGFP. Le but est de détecter une possible modification de la quantité totale de récepteurs (à la membrane et dans le cytoplasme) lorsque les cellules sont traitées avec les différentes molécules utilisées. Les résultats des cellules en présence des différents ligands sont représentés en figure 45. Aucune différence n'est distinguée, indiquant qu'il n'y a ni dégradation, ni production de T7-EGFP-hMOR pendant le temps de l'expérience.



De même les observations de la fluorescence totale des cellules après traitement aux différentes drogues (cytochalasine D et toxine pertussique) ont montré que les récepteurs étaient encore présents à la membrane. Les analyses par cytométrie de flux ont confirmé l'absence de modifications de la quantité de fluorescence totale due à l'EGFP, ce qui correspond à une quantité comparable de récepteur T7-EGFP-hMOR.

Enfin la survie des cellules en fonction des différentes drogues appliquées (cytochalasine D et toxine pertussique) a été vérifiée à 24 et 48h d'intervalle et n'est pas différente des cellules témoins. Ceci nous a permis de vérifier que les traitements utilisés lors de l'étude en dynamique ne sont pas létales pour les cellules.

7 – Le glycocalyx

Suite à la faible fixation des colloïdes sur les cellules (chapitre II, §2) et aux premières analyses en suivi de particule unique (chapitre IV, §1), la présence d'un glycocalyx sur la membrane plasmique des SH-SY5Y a été soupçonnée. Il a donc fallu déterminer son épaisseur et mettre au point un protocole pour le dégrader.

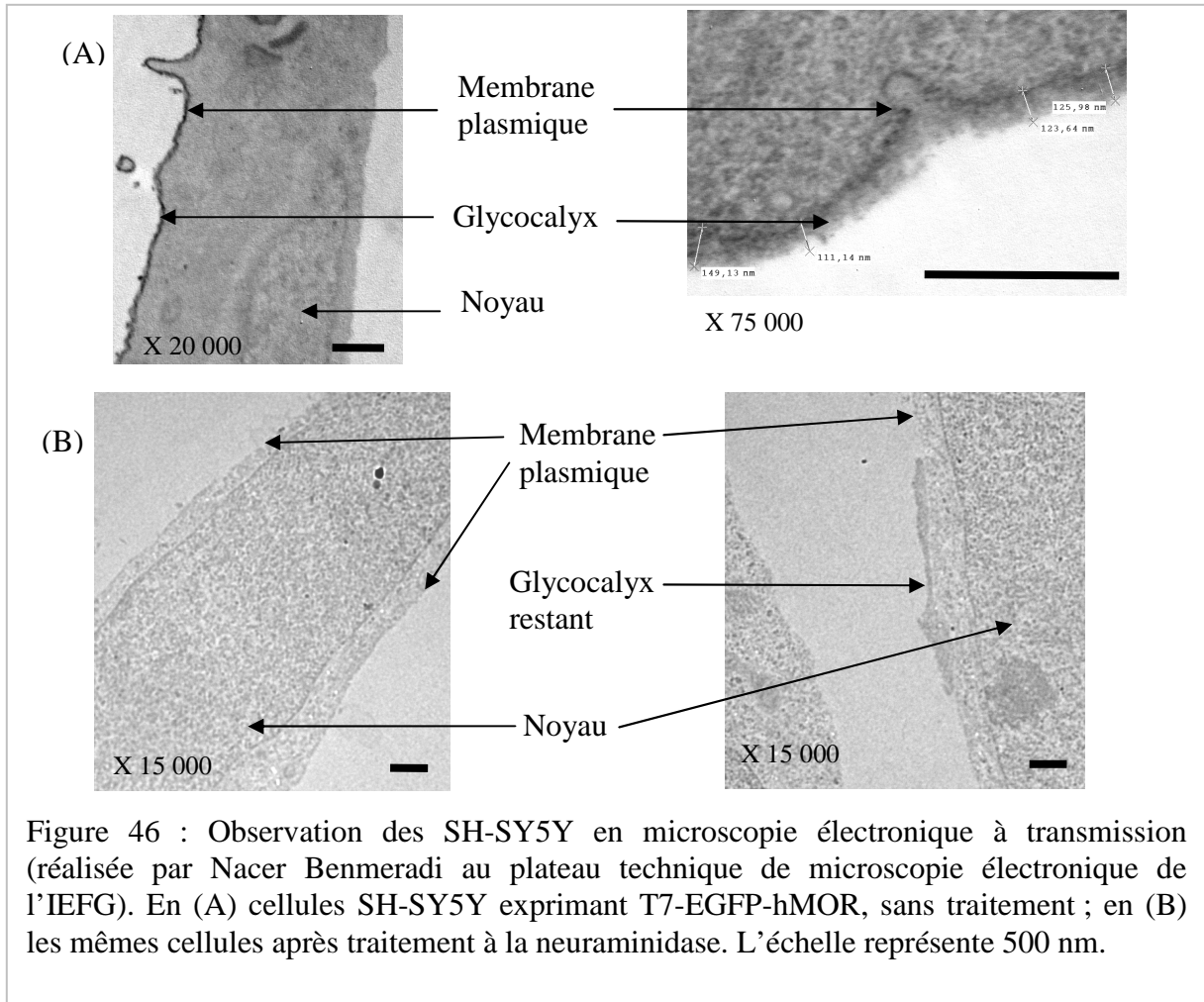
Le glycocalyx est constitué par l'ensemble des glucides à la surface des cellules eucaryotes. Son épaisseur varie d'un type cellulaire à l'autre, il est particulièrement épais au niveau des cellules cancéreuses. Les lignées cellulaires maintenues en culture (telles que les HEK ou les CHO) ne présentent pas, ou peu, de manteau cellulaire dense. Ce dernier a de nombreux rôles : il influence les relations entre les cellules, participe à la fonction de certains récepteurs ou bien modifie la reconnaissance des cellules par le système immunitaire

(Schauer, 1985). Un exemple de ce dernier cas est le masquage des antigènes de surface des cellules lymphocytaires B par les sucres extracellulaires, empêchant ainsi leur reconnaissance par les cellules lymphocytaires T (Bagriacik, 1999 ; Powell, 1987). Le glycocalyx des cellules malignes est encore plus dense, protégeant ainsi les tumeurs d'une reconnaissance par les lymphocytes (Schauer, 1985).

Différentes drogues ayant pour cible les liaisons sucre-sucre existent pour le dégrader. Leur efficacité est variable en fonction de l'épaisseur, et de la nature des sucres impliqués. La neuraminidase, qui agit sur les liaisons α -2(3,6,8,9) des acides sialiques, est de loin la plus efficace (Fritsch, 1975 ; Le Grimellec, 1994). Elle a notamment permis de dégrader presque entièrement le glycocalyx (de 100 à 200 nm d'épaisseur) de cellules épithéliales (Fritsch, 1975). Par ailleurs *l'effet neuraminidase* sur les cellules cancéreuses est caractérisé par une augmentation de la reconnaissance de ces dernières par les lymphocytes T suite à la mise à jour de leurs antigènes membranaires (Bagriacik, 1999). Enfin cette enzyme n'est pas capable de traverser la membrane plasmique et n'altère en rien la viabilité des cellules, ce qui est essentiel pour des études sur cellules vivantes.

Des analyses en microscopie électronique à transmission ont été effectuées (fig. 46A). On observe un glycocalyx d'une centaine de nanomètres d'épaisseur (100 ± 50 nm) sans qu'aucun traitement contrastant n'ait été appliqué sur les cellules. L'apparition des sucres de manière aussi contrastée indique donc un glycocalyx très dense. Ce dernier est uniquement situé au niveau de la membrane plasmique en contact avec le milieu extracellulaire, et non au niveau de celle adhérente sur la lamelle. Après incubation des cellules avec la neuraminidase (0,1 U/mL, 30 minutes à 37°C), l'observation en microscopie électronique révèle la disparition du glycocalyx (fig. 46B), même si des zones sont encore visibles, de manière très partielle, ceci étant peut-être dû à des difficultés d'accès de l'enzyme. La dégradation obtenue sur cellules épithéliales était comparable c'est-à-dire presque totale (Fritsch, 1975).

Ce traitement à la neuraminidase sera donc appliqué au préalable des analyses nécessitant l'absence de glycocalyx c'est-à-dire principalement les mesures de suivi de particule unique.



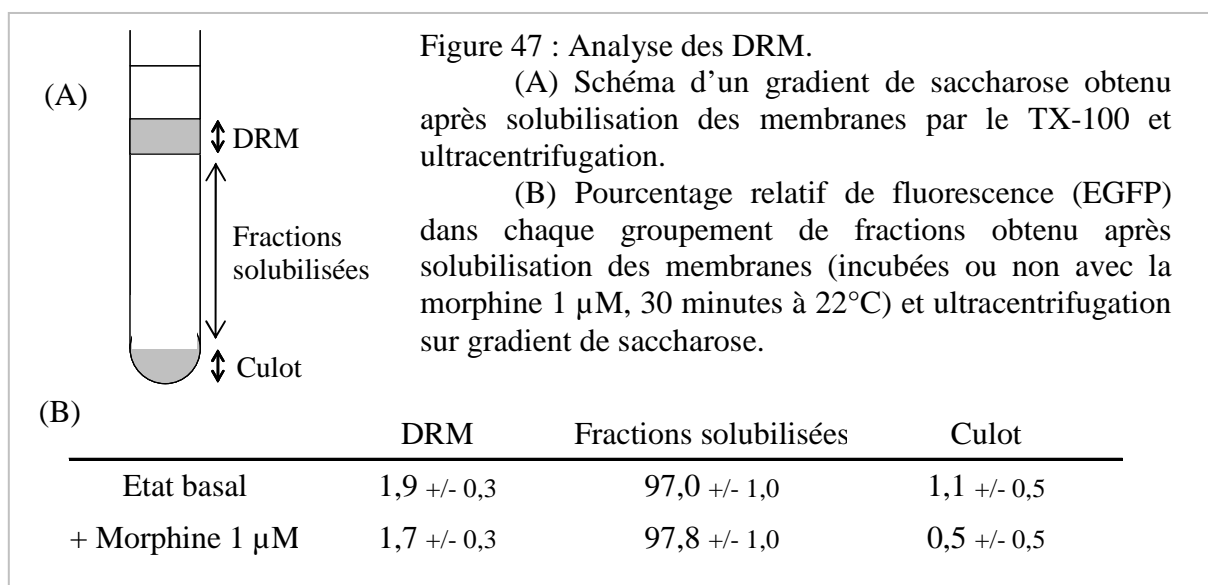
8 – Présence du récepteur dans les DRMs ?

En plus de l'organisation des constituants membranaires par le réseau d'actine, un autre modèle d'organisation fréquemment rencontré est généré par la présence de domaines particuliers, enrichis en cholestérol et sphingomyéline, les *rafts*. Afin de déterminer leur présence, deux protocoles sont envisageables. Soit une analyse en dynamique sur les cellules déplétée en cholestérol, soit une extraction au détergent des membranes. Ces deux techniques présentent des inconvénients. La déplétion en cholestérol ne permet pas d'enlever la totalité de ce constituant, et peut entraîner des effets secondaires, en particulier sur le cytosquelette. L'extraction au détergent est une méthode invasive qui se fait sur membranes et non sur cellules vivantes, qui plus est à 4°C.

Nous avons choisi cette seconde méthode, car plus rapide que la première, en particulier grâce au protocole déjà en place dans l'équipe. La déplétion en cholestérol nécessite en effet de la mettre au point sur nos cellules particulières, c'est-à-dire de faire de nombreux dosages et tests à différentes conditions.

Claire Millot a donc réalisé des extractions au détergent TX100, à 4°C, sur les membranes de cellules exprimant T7-EGFP-hMOR. Ce dernier a ensuite été recherché dans les fractions rafts et non-raft du gradient par Western Blot et par une quantification de la fluorescence grâce à la EGFP (fig. 47). Il s'avère que le récepteur T7-EGFP-hMOR est très majoritairement présent dans les fractions solubilisées et n'est pas enrichi dans les fractions riches en cholestérol (DRM).

La même étude a été réalisée après mise en contact des cellules pendant 30 minutes avec de la morphine à 1 µM et à température ambiante. Les rafts obtenus à partir des membranes de ces cellules ne contiennent pas non plus le récepteur T7-EGFP-hMOR (fig. 47).



Ces résultats à eux seuls ne suffisent pas à éliminer totalement l'hypothèse de la présence du récepteur dans les domaines rafts. Il faudrait les corrélés avec des analyses sur cellules déplétées ou bien vérifier l'effet d'autres détergents. Néanmoins, au vu des résultats très controversés que ces expériences engendrent, et du temps nécessaire pour les mener, nous n'avons pas insisté dans cette voie.

Les analyses pharmacologiques ont donc révélé que le récepteur T7-EGFP-hMOR transfecté de manière stable dans les SH-SY5Y était fonctionnel, et environ dix fois plus exprimé que le récepteur endogène. Il est capable de fixer les quatre ligands testés, mais également de transmettre le signal (inhibition de l'adénylyl cyclase) et d'être internalisé dans le cas des agonistes. Ceci indique que ces cellules possèdent la machinerie protéique nécessaire à l'expression fonctionnelle de notre récepteur. La composition membranaire des

cellules a également été vérifiée, ainsi que la capacité d'intégrer des lipides exogènes. La membrane plasmique n'est pas perturbée par la transfection stable.

De plus différents traitements contre les protéines G, le cytosquelette ou bien le glycocalyx, ont été mis au point. Ceci va nous permettre de déterminer l'influence de ces différents paramètres sur la diffusion de T7-EGFP-hMOR dans la membrane des SH-SY5Y en comparant la diffusion de ce dernier sur des cellules avec ou sans traitement.

A présent que les techniques et le système cellulaire sont mis au point et calibrés, nous allons nous intéresser à la dynamique latérale du récepteur T7-EGFP-hMOR (appelé μ^* par la suite) dans la membrane de SH-SY5Y, analysée par FRAPrv et SPT.

Chapitre IV

ANALYSE PAR FRAPrv et SPT DE LA DIFFUSION LATÉRALE DU RECEPTEUR MU OPIOÏDE HUMAIN

La diffusion du récepteur μ^* a été étudiée par les deux techniques précédemment décrites. A température ambiante, elles ont révélé une double compartimentation des récepteurs dans des domaines perméables de près de 1 μm de rayon (FRAPrv) d'une part et dans des domaines de rayon inférieur à 250 nm (SPT) d'autre part. De plus l'analyse en SPT a mis en évidence une population de récepteurs (un tiers) présentant une diffusion dirigée. Par la suite les modifications de l'organisation membranaire du récepteur μ^* en fonction de la température d'observation seront décrites et discutées.

Afin de rechercher l'origine des domaines observés, les effets de la déstabilisation du cytosquelette d'actine et du blocage de l'interaction des protéines G avec les récepteurs ont été étudiés. Les grands domaines mettent en jeu une interaction avec les protéines G alors que le cytosquelette influe sur la proportion de récepteurs ayant une diffusion dirigée. Enfin, les conséquences de la fixation de différents ligands sur l'organisation du récepteur ont été étudiées.

Ces différentes expériences ont permis de proposer un modèle d'organisation du récepteur μ^* dans la membrane, organisation qui se révèle complexe et influencée par de nombreux paramètres : température, protéines G, cytosquelette et état d'activation du récepteur. Ces travaux soulignent l'intérêt de l'utilisation conjointe de ces deux techniques pour l'obtention d'une vision globale de l'organisation dynamique membranaire.

L'analyse de l'organisation latérale du récepteur μ^* a été effectuée dans différentes conditions : lorsque le récepteur est à l'état basal et lorsqu'il est activé par un ligand. A chaque fois, nous avons recherché les origines possibles des types de diffusion observés. De plus, l'influence de la température sur la diffusion du récepteur μ^* à l'état basal a été particulièrement étudiée. Nous commencerons par présenter l'analyse de l'organisation latérale du récepteur à l'état basal par FRAPrv et SPT, à température ambiante soit 22 ± 1 °C.

1 – Analyse à l'état basal

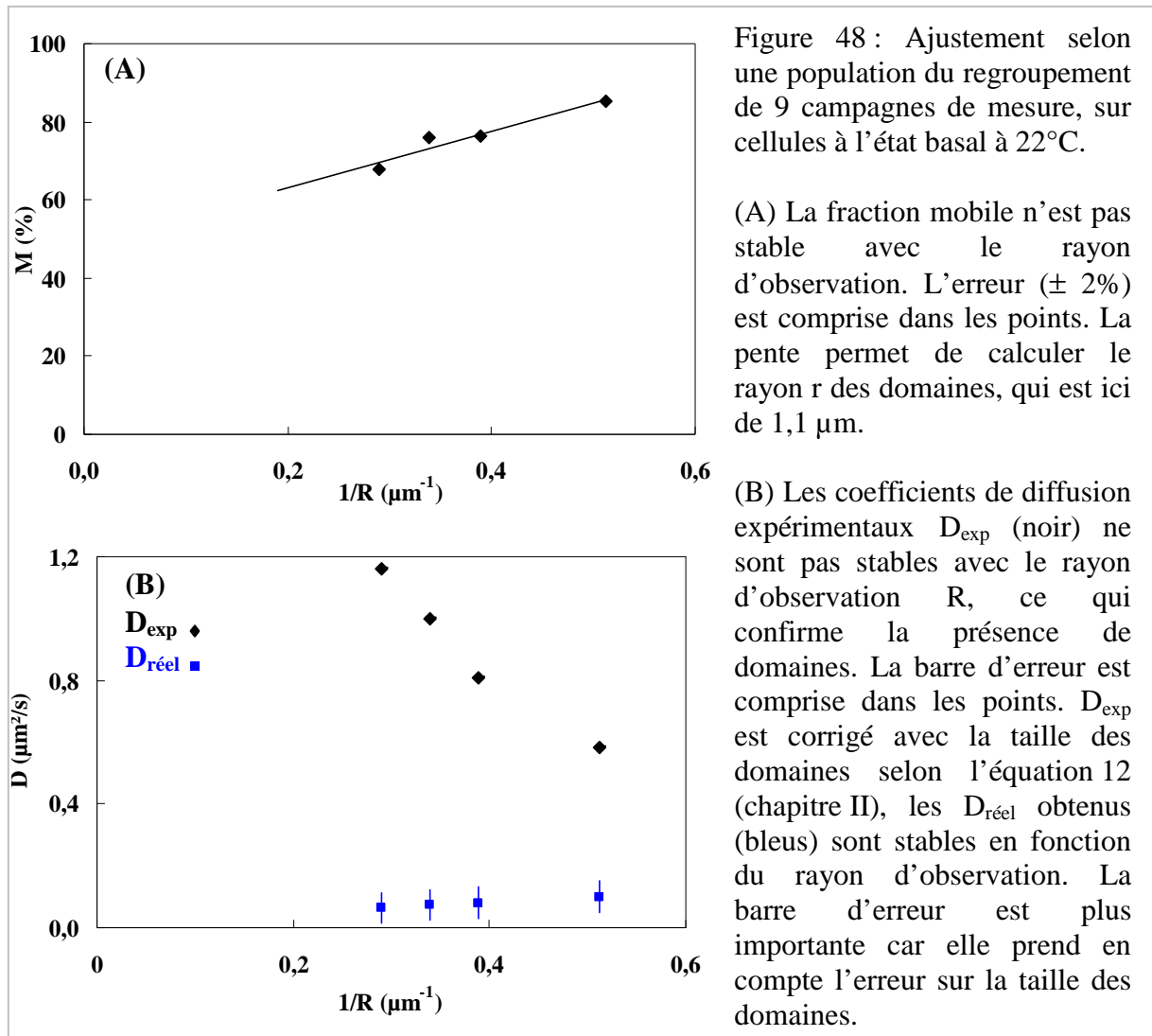
1.1 - Organisation à température ambiante

1.1.1 – Analyse par FRAP à rayon variable

→ Résultats

La nécessité d'effectuer un témoin à l'état basal pour chaque condition testée en FRAPrv a permis d'accumuler un très grand nombre de fichiers, et donc de faire une analyse à grande échelle des résultats obtenus. Ainsi 250 retours de fluorescence accumulés sur 9 campagnes de mesure ont été regroupés pour chaque rayon. Ceci a amélioré significativement le rapport signal sur bruit par rapport à une seule campagne de mesure. En raison du plus grand nombre d'expériences réalisées, les résultats présentés ici diffèrent donc légèrement des premiers publiés (Sauliere, 2006). Ils ont permis d'accéder à plus d'informations sur l'organisation latérale du récepteur μ^* , et de proposer un modèle de compartimentation.

L'ajustement du regroupement de 9 campagnes de mesure selon l'hypothèse de l'existence d'une seule population montre que ni le coefficient de diffusion, ni les fractions mobiles ne sont constants en fonction du rayon d'observation (fig. 48). Le tracé de la fraction mobile en fonction de l'inverse du rayon d'observation révèle une organisation du récepteur μ^* dans des domaines d'assez grande taille : $1,1 \pm 0,2$ μm de rayon à l'intérieur desquels ils diffusent avec un coefficient de diffusion réel de $(8 \pm 4) \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$. La droite $M=f(1/R)$ coupe l'axe des ordonnées à une valeur M_p de 49 ± 6 %, ce qui indique qu'il existe une probabilité pour les récepteurs de sortir des domaines et de diffuser à longue distance. A partir des données précédentes de l'équipe (Salome, 1998), une telle valeur peut s'expliquer par des domaines jointifs qui ont seulement 10% d'ouverture de leur périmètre.



Cette fraction mobile permanente importante peut également s'expliquer par l'existence de deux populations : l'une à l'intérieur de domaines disjoints, l'autre à l'extérieur. L'ajustement selon cette hypothèse des données regroupées a entraîné une amélioration significative de la somme des carrés des écarts entre les données et l'ajustement (7 % en moyenne sur les quatre rayons). Deux coefficients de diffusion sont obtenus : le premier est invariant en fonction du rayon d'observation ; ce qui correspond aux récepteurs capables de diffuser à longue distance (D_{libre}) et est égal à $0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (tableau 10). Le second coefficient de diffusion augmente avec la taille du rayon d'observation, il correspond aux récepteurs présents à l'intérieur des domaines. Il est nécessaire de le corriger selon l'équation 12 (chapitre II) qui prend en compte la taille des domaines obtenue à partir de la pente de $M=f(1/R)$. Le coefficient de diffusion réel ainsi obtenu vaut $0,2 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ et est appelé D_{conf} .

	Ajustement à une population	Ajustement à deux populations
Rayon des domaines (μm)	$1,1 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
M_p (%)	49 ± 6	56 ± 5
D_{conf} Réel ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	$(8 \pm 4) \cdot 10^{-2}$	$(4 \pm 1) \cdot 10^{-1}$
D_{libre} Réel ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)		$(2 \pm 1) \cdot 10^{-1}$
Proportion (P) de récepteurs libres (%)	-	63 ± 6

Tableau 10: Paramètres obtenus selon l'ajustement à une ou à deux populations du regroupement global de 250 retours de fluorescence des cellules à l'état basal, à 22°C.

Nous avons également accès à la proportion (P) de récepteurs diffusant avec chaque coefficient de diffusion. Ainsi les récepteurs avec le coefficient de diffusion D_{libre} représentent $63 \pm 6\%$ des récepteurs totaux. Cette valeur est tout à fait comparable avec la fraction mobile permanente (56 %) obtenue à partir de l'ordonnée à l'origine de la droite M en fonction de l'inverse du rayon d'observation. Ces résultats concordants appuient l'existence de la possibilité pour les récepteurs de diffuser à longue distance.

La taille des domaines est identique selon ces deux analyses, contrairement aux coefficients de diffusion selon l'analyse 1D ou selon l'analyse 2D, différents d'un facteur trois environ. D_{conf} et D_{libre} étant proches, la valeur de D obtenue lors de l'analyse à une population devrait être identique, ce qui n'est pas le cas. Cette différence est en partie liée aux barres d'erreurs, mais n'est pas totalement expliquée.

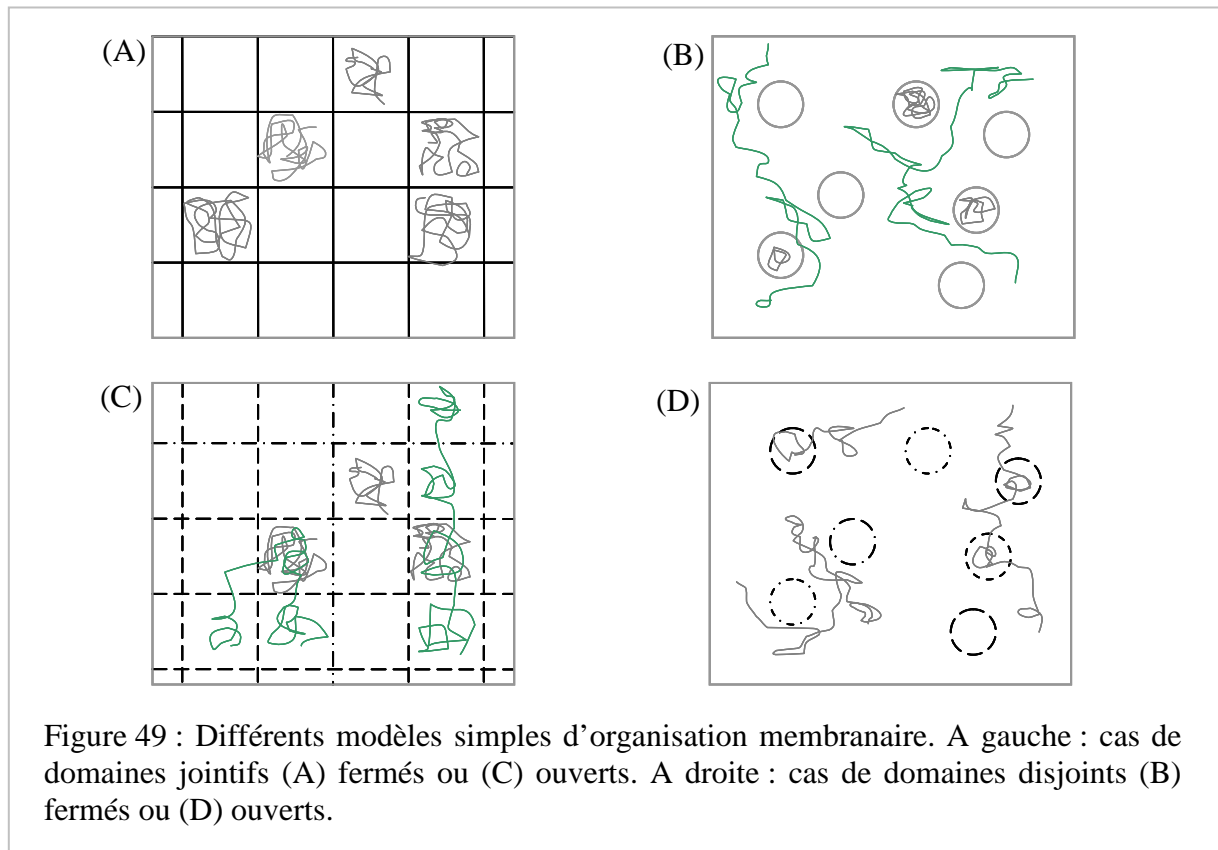
→ Modèles d'organisation latérale

Deux cas simples d'organisation en domaines peuvent être imaginés : soit les domaines sont jointifs, soit ils sont disjoints. Chacune de ces possibilités peut être subdivisée en deux : domaines fermés ou ouverts (fig. 49).

L'existence d'une population de récepteurs capables de diffuser à longue distance élimine le cas où cette diffusion est impossible, c'est-à-dire quand les domaines sont jointifs et fermés (A). Les trois autres possibilités ne peuvent être formellement exclues. Néanmoins, le fait que les deux populations aient des coefficients de diffusion proches indique que les récepteurs sont dans des environnements comparables. Il est donc probable que les récepteurs capables de diffuser à longue distance se déplacent de domaines en domaines (C), plutôt qu'entre des domaines disjoints (B). Dans ce dernier cas en effet, les récepteurs diffusant de

manière aléatoire entre les domaines devraient avoir un coefficient de diffusion plus élevé que dans les domaines. D'autres schéma d'organisation plus complexes sont bien sur envisageables. Ceux présentés ici sont basés sur les simulations réalisées pour le FRAPrv.

En prenant en compte la taille des cellules (6 μm de rayon) et celle des domaines (1 μm de rayon), et selon le cas (C), la membrane des cellules serait composée d'environ 200 domaines jointifs perméables.



La question se pose de savoir si l'interprétation selon *deux populations* est réellement justifiée pour nos résultats. En effet, les deux valeurs D_{conf} et D_{libre} ne sont pas significativement différentes et chaque population représente environ 50 % des récepteurs. Ces deux populations ne se différencient que par la capacité de diffusion à longue distance de l'une d'elle. Dans l'hypothèse d'une organisation telle que présentée en figure 49C, tous les récepteurs sont dans des domaines avec une probabilité de passage d'un domaine à l'autre. Il est donc difficile de parler de deux populations strictement différenciées.

Il est plus pertinent de considérer qu'il n'y a qu'une seule population de récepteurs μ^* qui diffusent dans des domaines jointifs avec une probabilité de passage d'un domaine à l'autre, ce qui génère une diffusion à longue distance.

De manière pratique, ces résultats nous ont permis de comprendre pourquoi l'ajustement selon une ou deux populations des données obtenues à partir d'une seule campagne ne montre pas de différence significative de la somme des carrés des écarts. En effet les deux populations représentent chacune 50 % des récepteurs, et ont des coefficients de diffusion très proches, ce qui nécessite un bon ratio signal sur bruit, c'est-à-dire un grand nombre de retours de fluorescence, pour pouvoir les distinguer de manière significative.

L'analyse par FRAP à rayon variable a donc révélé une organisation du récepteur μ^* dans des domaines perméables de grande taille. L'analyse des données selon l'hypothèse de deux populations a permis de déterminer la proportion de récepteurs capables de diffuser à longue distance. Elle a également mis à jour l'équivalence des coefficients de diffusion des *deux populations* (D_{libre} et D_{conf}). Ceci nous a permis de conclure que l'interprétation des données avec deux populations est inadéquate dans le cas du récepteur μ^* . L'ajustement des données selon l'hypothèse d'une seule population permet d'identifier l'existence de domaines, d'en caractériser la taille et la probabilité de passage de l'un à l'autre.

Cette analyse n'a pu être réalisée que grâce au grand nombre de fichiers accumulés, ce qui ne sera pas le cas avec les différentes conditions testées. Par la suite les retours de fluorescence seront analysés selon les deux modèles. Dans le cas où l'ajustement à deux populations ne permettra pas une amélioration significative de la somme des carrés des écarts par rapport à l'ajustement à une population, alors c'est le modèle d'organisation tel que décrit ci-dessus (fig. 49C) qui sera considéré. Dans le cas contraire cela indiquera un changement important de l'organisation du récepteur μ^* dans la membrane.

1.1.2 – Influence du glycocalyx

→ Premiers résultats de SPT

Les premières observations en suivi de particule unique ont été réalisées sur les neuroblastomes surexprimant T7-EGFP-hMOR sans pré-traitement préalable. Les colloïdes utilisés sont fonctionnalisés selon le protocole de « double couche » (cf. chapitre II ; §2 et annexe matériel et méthodes), avec une concentration d'anticorps anti T7 de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ pour une quantité de 9.10^{10} colloïdes/mL.

Quarante trajectoires ont été enregistrées et analysées. Elles peuvent être réparties en quatre types de diffusion : confinée, confinée superposée avec une diffusion aléatoire aux temps longs, aléatoire et dirigée. Ces trajectoires ne sont pas montrées ici car elles sont peu représentatives des trajectoires typiques de ces modes de diffusion. Ceci est d'ailleurs le premier critère de reconnaissance d'un problème lié à ces premières expériences de SPT.

Le second critère majeur a été la valeur moyenne du coefficient de diffusion aux temps courts (calculés grâce à la pente à l'origine de la MSD en fonction du temps : D_{1-2}), égale à $(2,2 \pm 3,8) \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Afin de pouvoir établir une comparaison avec le FRAP, cette valeur a également été calculée sans prendre en compte les coefficients de diffusion des trajectoires dirigées, considérés trop faibles pour être distingués par cette technique. La valeur obtenue $(3,1 \pm 4,1 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s})$ diffère encore significativement du coefficient de diffusion moyen des récepteurs mesuré en FRAPrv ($8 \pm 4 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$).

Associé au faible nombre de colloïdes capables de se fixer sur les cellules (cf. chapitre II), ces résultats ont porté le soupçon sur l'existence d'un glycocalyx important. Ce manteau de saccharides a été révélé en microscopie électronique, et un protocole de dégradation a été mis au point (cf. chapitre III). Toutes les analyses suivantes, en SPT, ont été réalisées sur cellules pré-traitées à la neuraminidase, c'est-à-dire après dégradation du glycocalyx.

→ Effet du glycocalyx sur la diffusion de μ^* observée par FRAPrv

Tout d'abord, il a fallu déterminer si la destruction du glycocalyx modifiait la dynamique du récepteur observée en FRAPrv. En effet la question d'une perturbation de la diffusion du récepteur par le glycocalyx par le biais de l'EGFP extracellulaire pouvait se poser. La dégradation de ce manteau de saccharides ne modifie pas la diffusion du récepteur ni au niveau de son organisation en domaines, ni en terme de coefficient de diffusion (fig. 50). Cette vérification faite, les observations en suivi de particule unique, après dégradation du glycocalyx, ont pu être menées.

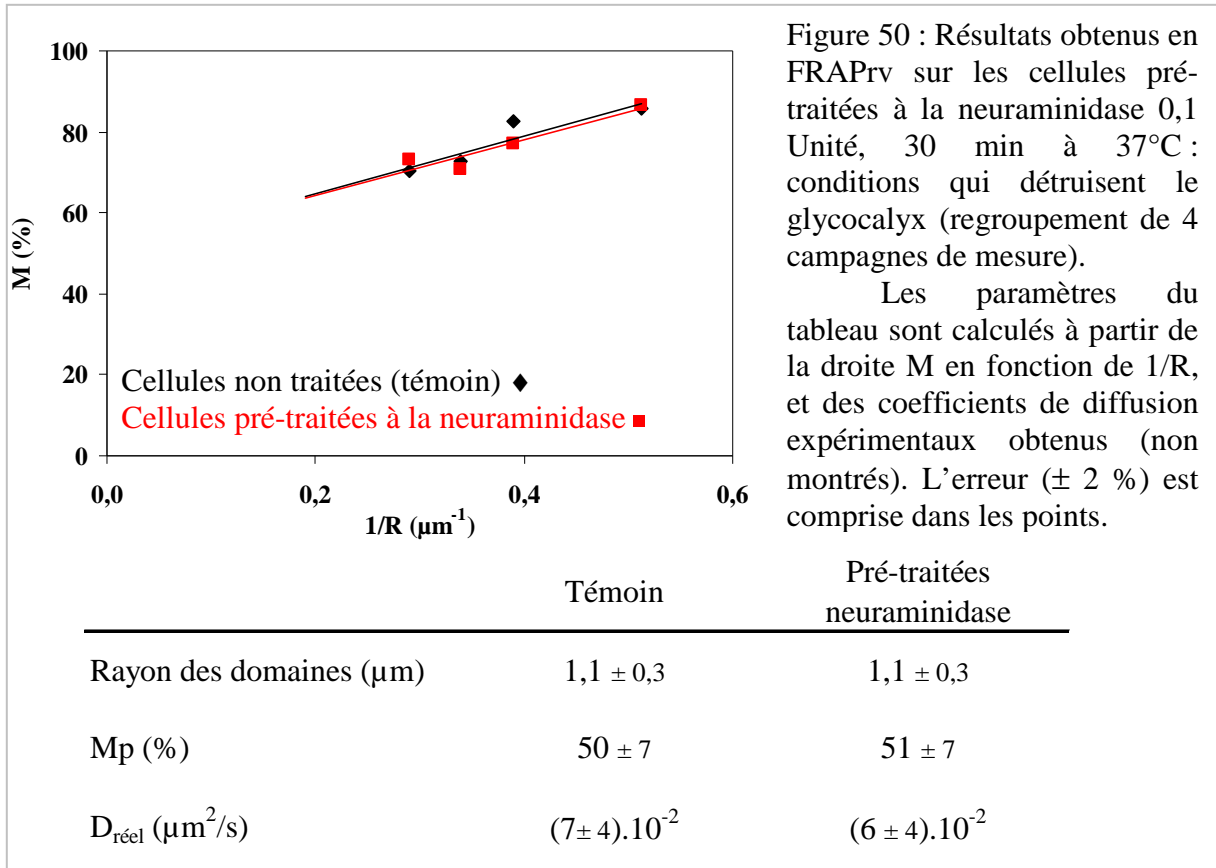


Figure 50 : Résultats obtenus en FRAP_{Prv} sur les cellules pré-traitées à la neuraminidase 0,1 Unité, 30 min à 37°C : conditions qui détruisent le glycocalyx (regroupement de 4 campagnes de mesure).

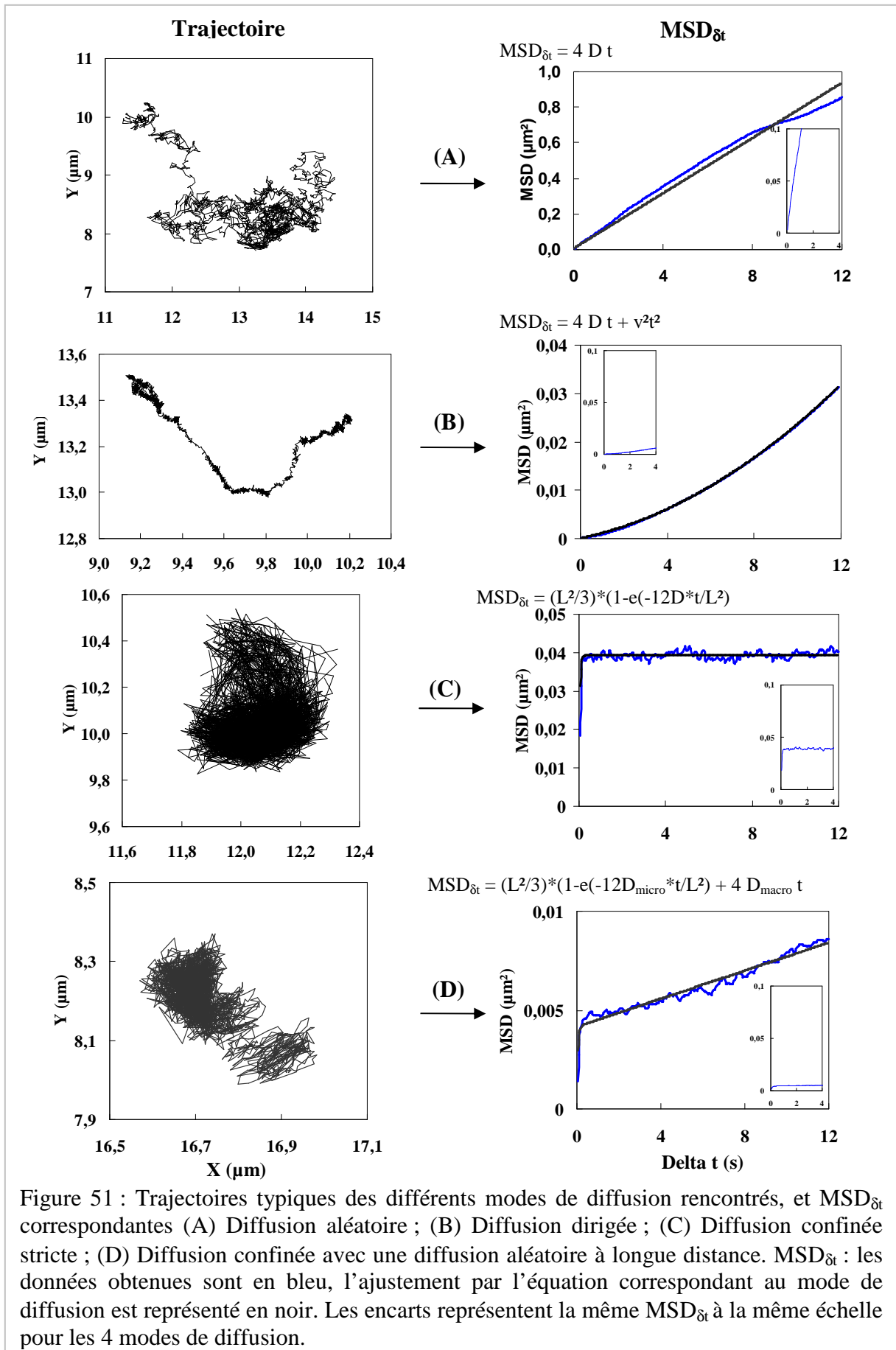
Les paramètres du tableau sont calculés à partir de la droite M en fonction de 1/R, et des coefficients de diffusion expérimentaux obtenus (non montrés). L'erreur (± 2 %) est comprise dans les points.

1.1.3 – Analyse en SPT, après dégradation du glycocalyx

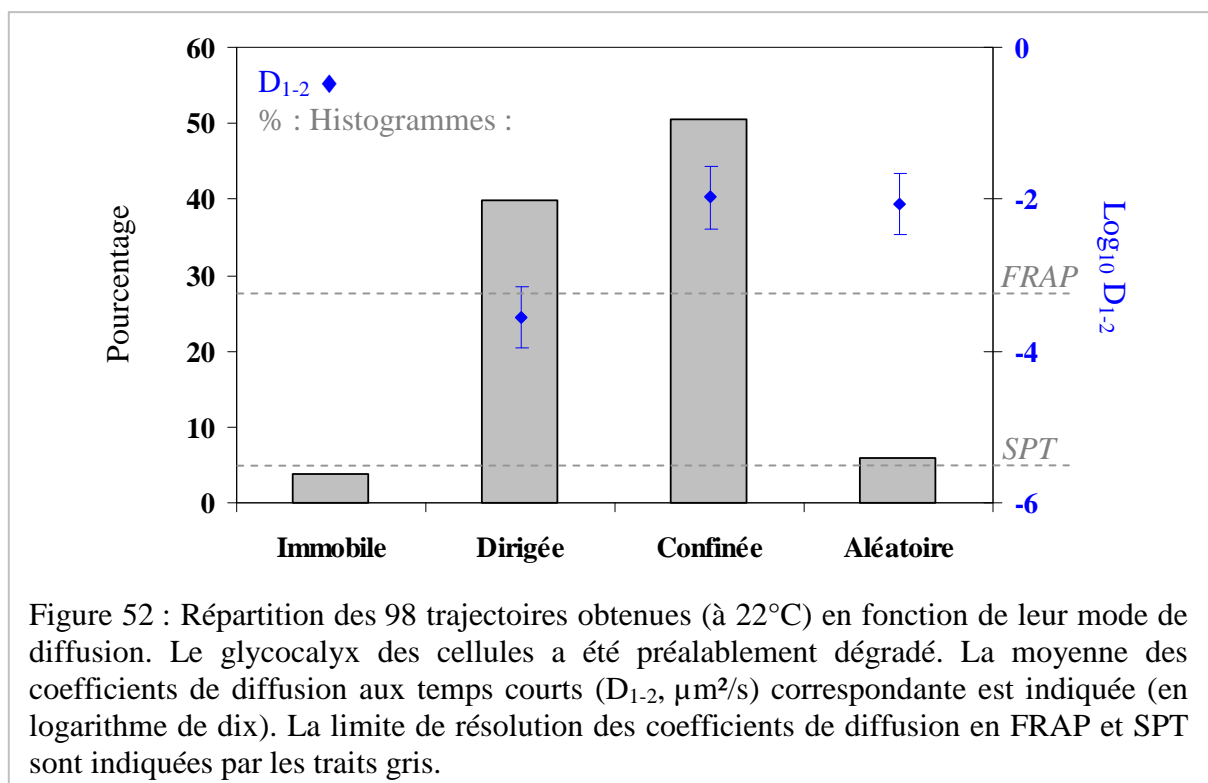
→ Les différents modes de diffusion observés

Les trajectoires (2 minutes) de 117 colloïdes ont été établies à température ambiante, sur cellules pré-traitées à la neuraminidase. Après analyse, nous avons conservé 98 de ces trajectoires, les autres étant rejetées. Les principaux critères de rejet sont un déplacement des cellules pendant la durée de l'enregistrement, ou une trajectoire incomplète. En effet, la position du colloïde ne peut parfois pas être déterminée (accélération soudaine, perte du colloïde, présence de vésicules trop proches).

Elles ont été classées en quatre catégories en fonction du mode de diffusion : immobile, aléatoire, dirigée et confinée. Cette dernière catégorie regroupe les trajectoires présentant une diffusion confinée stricte, et celles avec une diffusion confinée à laquelle se superpose un déplacement aléatoire à longue distance. Ces sous-groupes et les tailles de domaines seront détaillés par la suite. Les récepteurs immobiles ont des trajectoires, MSD_{δt}, et D₁₋₂ calculé le long de la trajectoire typique, qui sont montrés dans le chapitre II (fig. 33). Des trajectoires typiques, ainsi que les MSD_{δt} associées des autres modes de diffusion sont représentées en figure 51.

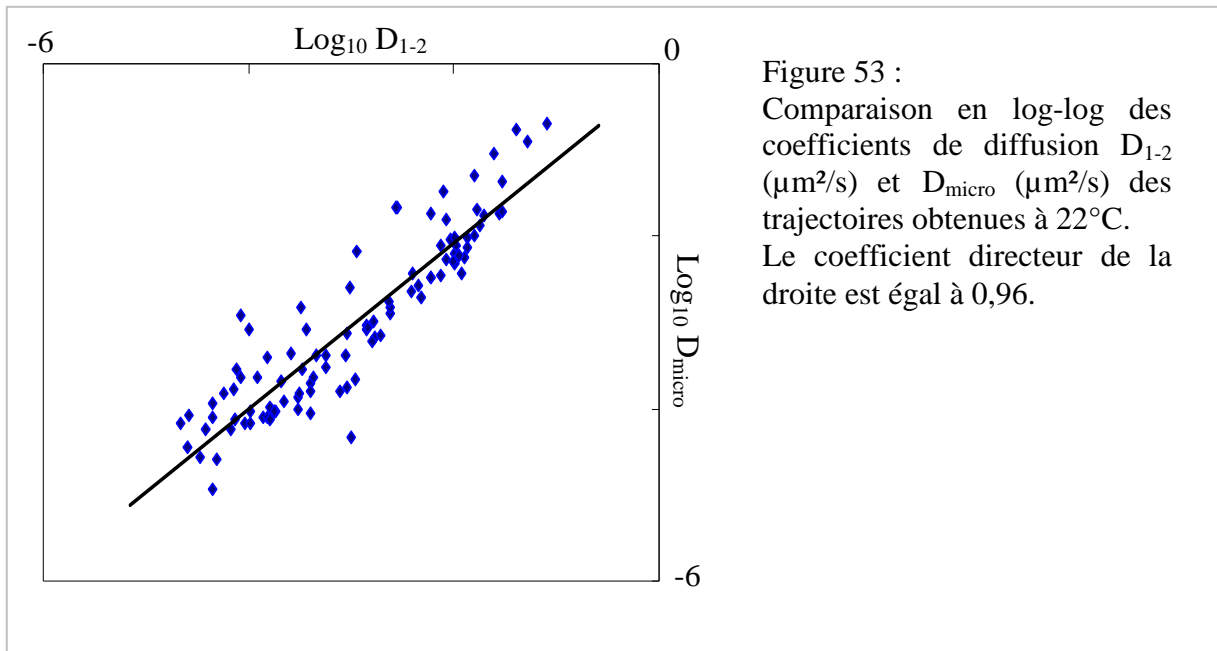


Les proportions de chaque mode de diffusion, ainsi que le coefficient D_{1-2} moyen correspondant, sont représentés en figure 52. Les récepteurs présentent majoritairement des diffusions dirigées (40 %) ou confinées (50 %). Les 10 % restants ont une diffusion aléatoire ou ne se déplacent pas (récepteurs immobiles). Les coefficients de diffusion des trajectoires dirigées sont plus faibles que ceux des trajectoires confinées et aléatoires.



Un des critères de vérification de l'ajustement des MSD en fonction du temps consiste à comparer le D_{1-2} (pente à l'origine à partir des deux premiers points de cette courbe) avec le D microscopique (D_{micro} , obtenu par ajustement des données avec les équations théoriques). Les points s'alignent sur une droite de pente proche de 1 (fig. 53), ce qui permet de valider l'ajustement des $\text{MSD}_{\delta t}$ par les équations des différents modes de diffusion.

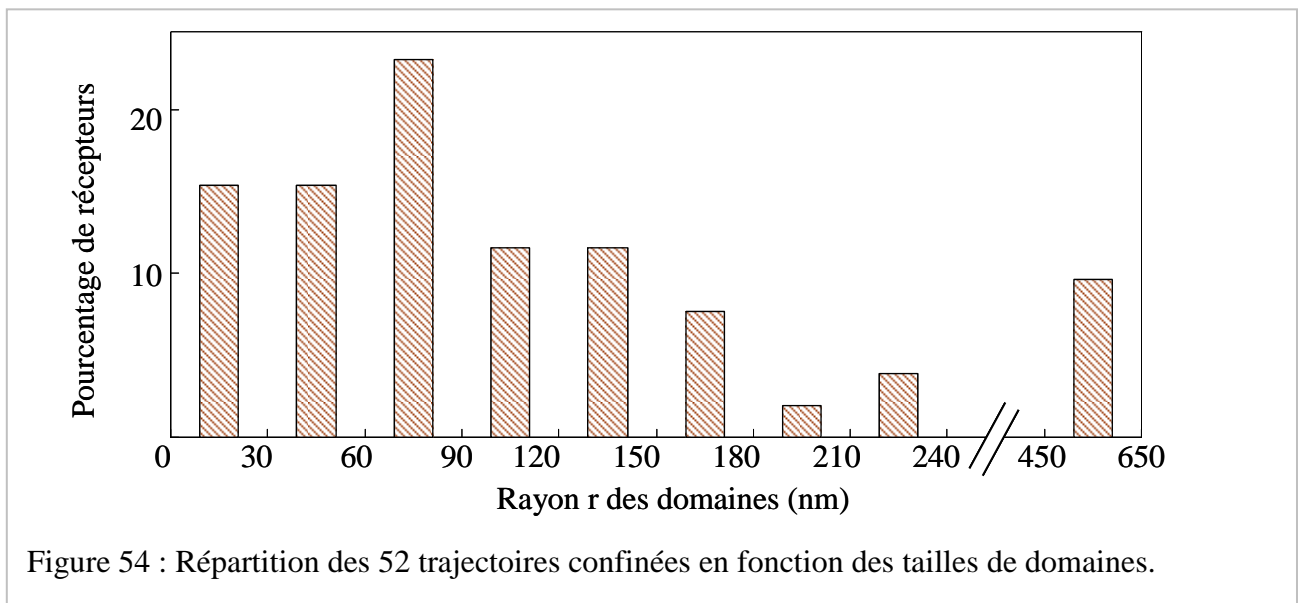
Par la suite, nous utiliserons principalement le D_{1-2} comme coefficient de diffusion aux temps courts. D'une part il est calculé indépendamment du mode de diffusion, d'autre part aucun autre paramètre ne rentre en jeu lors de son calcul. Le D_{micro} obtenu à partir de l'ajustement par l'équation théorique sera utilisé uniquement quand il s'agira de le comparer avec d'autres paramètres obtenus par ce même ajustement.



→ **Les trajectoires confinées**

Nous allons tout d’abord considérer les trajectoires confinées en fonction de la taille moyenne des domaines dans lesquels les récepteurs diffusent. Dans un deuxième temps nous discuterons du coefficient de diffusion à longue distance (D_{MACRO}).

Parmi les récepteurs présentant des trajectoires confinées (cf fig. 51C et 51D), la grande majorité diffusent dans des domaines de taille inférieure à 250 nm de rayon (fig. 54). Seules cinq trajectoires correspondent à des confinements de plus grande taille comprises entre 450 et 650 nm (fig. 54).



La majorité des trajectoires présentant un confinement correspondent à une diffusion confinée auquel se superpose une diffusion à longue distance (44 sur 52 trajectoires). Ce déplacement à longue distance suit une diffusion aléatoire et est caractérisé par un D_{MACRO} , plus lent que le D_{micro} . Cette catégorie est particulièrement représentée parmi les récepteurs qui diffusent dans les plus petits domaines.

Sur ces 44 trajectoires, 19 ont un D_{MACRO} moins de 20 fois plus lent que le D_{micro} , 15 ont une diffusion à longue distance diminuée d'un facteur 20 à 150, les 10 restantes étant particulièrement ralenties : d'un facteur 150 à 1000. L'analyse des D_{micro} en fonction des D_{MACRO} , sur un graphique en log-log, ne permet pas de trouver une corrélation entre ces deux valeurs, les points sont dispersés et ne s'alignent pas sur une droite. Néanmoins si on enlève les 10 trajectoires présentant une réduction très importante du coefficient de diffusion à longue distance, alors les points respectent une droite de pente 0,9 indiquant dès lors une bonne corrélation entre D_{micro} et D_{MACRO} .

Enfin une analyse approfondie permet de déterminer si la diffusion à longue distance de ces trajectoires est due à des sauts entre domaines (Meilhac, 2006). Cette étude se base sur le profil de probabilité de confinement en fonction du temps (cf. chapitre II, §2.4.2). Seuls les cas où le D_{micro} est plus de 20 fois plus grand que le D_{MACRO} permettent cette analyse, soit 25 trajectoires dans notre cas. La quantité de saut détectée est de l'ordre de ce qui est attendu dans un modèle de barrières. Néanmoins il serait utile d'accumuler plus de trajectoires afin d'affiner cette étude, qui manque de données pour être statistiquement fiable.

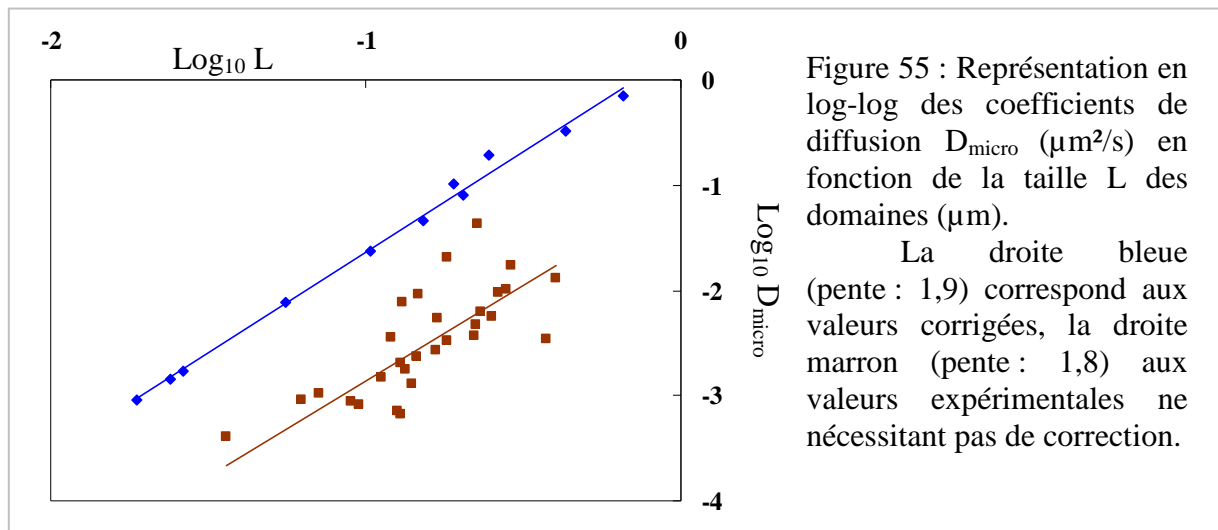
→ Variations du coefficient de diffusion avec la taille des domaines

D'autres informations peuvent être obtenues à partir de ces trajectoires, notamment en analysant la variation des coefficients de diffusion D_{micro} et D_{1-2} avec la taille des domaines L . En représentation log-log, les couples (D_{micro}, L) sont assez dispersés et ne permettent pas un ajustement par une droite.

Nous avons alors cherché si les calculs des D_{micro} et des L n'étaient pas biaisés. En effet ceci est le cas lorsque le temps caractéristique de présence de la protéine dans un domaine (τ_m) est inférieur à deux fois la fréquence d'acquisition (Destainville, 2006). Au contraire les paramètres calculés sont considérés corrects (moins de 10 % d'erreur) lorsque :

$$\tau_m = \frac{L^2}{12D_{\text{micro}}} \geq 80ms \text{ (Eq. 25)}$$

Dans notre cas cette relation (Eq. 25) n'est pas vérifiée pour 15 trajectoires, 2 ne pouvant être corrigées, les paramètres des 13 autres ont été recalculés à partir des équations de Destainville *et coll.* (Destainville, 2006). Pris indépendamment les paramètres corrigés et non corrigés varient de la même manière. En représentation log-log, le tracé de D_{micro} en fonction de la taille des domaines L , est ajusté par une droite de pente proche de 2 (fig. 55). Ce résultat indique que le coefficient de diffusion varie selon la taille du domaine au carré : $D \sim L^2$.



L'analyse de la variation du D_{1-2} en fonction de la taille des domaines montre une plus faible dispersion des points qui s'alignent bien sur une droite de pente proche de 2 (fig. 56). Ceci est logique puisque nous avons vu précédemment que le D_{micro} et le D_{1-2} étaient bien corrélés entre eux (fig. 53). Cette variation du D en fonction de L^2 semble être limitée aux trajectoires présentant des tailles de domaines inférieures à 250 nm, les récepteurs présents dans les plus grands domaines (points rouges de la figure) étant décalés de la droite (fig. 56).

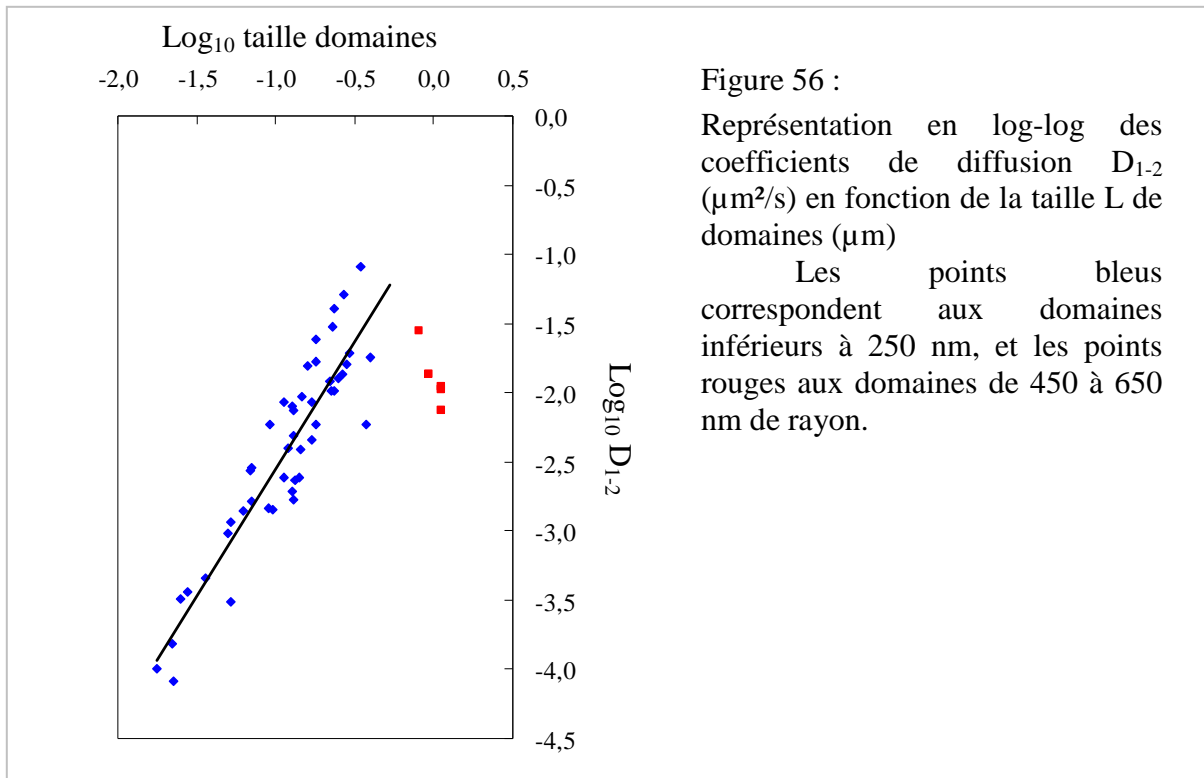


Figure 56 :

Représentation en log-log des coefficients de diffusion D_{1-2} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) en fonction de la taille L de domaines (μm)

Les points bleus correspondent aux domaines inférieurs à 250 nm, et les points rouges aux domaines de 450 à 650 nm de rayon.

La variation du coefficient de diffusion selon L^2 est un critère majeur du modèle de domaines régis par les interactions à longue distance (cf. chapitre I, §3.2.3). Le fait que les grands domaines ne suivent plus cette loi va également dans ce sens, en effet il est logique qu'il existe une portée maximum à ces interactions. On peut noter que cette différence en fonction de la taille est également présente, mais moins visible sur l'analyse de la variation du D_{micro} en fonction de L .

Ces résultats permettent de supposer que les petits et moyens domaines sont régis par des lois d'interaction à longue distance entre protéines, alors que les grands domaines auraient une autre origine. Néanmoins, les analyses réalisées sur les trajectoires présentant une diffusion confinée et une diffusion à longue distance superposée (cf. chapitre II, §2.4.2, (Meilhac, 2006)) ont permis de distinguer des sauts entre domaines. Ce résultat semble contraire au modèle d'interaction à longue distance des protéines, et va plutôt dans le sens d'un modèle de barrières formées par le cytosquelette. Néanmoins, ces sauts pourraient également être la signature de protéines s'échappant d'un domaine et passant dans un autre à cause de fluctuation dans les interactions. Il faut noter que cette analyse est faite sur moins de trajectoires (25) que celle analysant les variations du D_{1-2} en fonction de L (47). Afin de valider le modèle de barrières, il serait donc nécessaire d'enregistrer plus de trajectoires pour pouvoir faire des analyses statistiquement plus fiables.

En supposant que les plus grands domaines correspondent aux domaines observés en FRAPrv, nous pouvons donc conclure que le récepteur μ^* est organisé en double compartimentation dans la membrane, avec au moins deux origines. D'une part les interactions inter-protéines à longue distance (domaines inférieurs à 250 nm de rayon) et d'autre part une cause encore indéterminée pour les grands domaines. De plus nous avons vu que plus d'un tiers des récepteurs présentent des diffusions dirigées dont le lien avec le cytosquelette reste à montrer.

→ **Comparaison des résultats en présence et en absence du glycocalyx**

Les résultats obtenus en SPT à partir des cellules dont le glycocalyx a été dégradé, ont été comparés avec les premiers, obtenus sur cellules ayant conservé leur glycocalyx (tableau 11).

	Avec Glycocalyx	Sans Glycocalyx
Moyenne D_{1-2} , sans les diffusions dirigées, en $\mu\text{m}^2/\text{s}$	$(3,1 \pm 4,2) \cdot 10^{-3}$	$(1,0 \pm 1,4) \cdot 10^{-2}$
Moyenne D_{1-2} des diffusions dirigées, en $\mu\text{m}^2/\text{s}$	$(1,4 \pm 1,2) \cdot 10^{-4}$	$(2,8 \pm 3,4) \cdot 10^{-4}$
Vitesse moyenne des diffusions dirigées, en $\mu\text{m}/\text{s}$	$(7,4 \pm 3,1) \cdot 10^{-3}$	$(8,3 \pm 7,1) \cdot 10^{-3}$
D_{MACRO} moyen des diffusions confinées, en $\mu\text{m}^2/\text{s}$	$(3,7 \pm 3,1) \cdot 10^{-4}$	$(4,8 \pm 8,3) \cdot 10^{-4}$

Tableau 11 : Comparaison des différents paramètres obtenus pour les trajectoires du récepteur μ^* , sur cellules ayant conservé, ou non, leur glycocalyx.

La différence principale se situe au niveau du coefficient de diffusion aux temps courts, particulièrement pour les trajectoires présentant un type de diffusion autre que dirigée. C'est cette différence qui avait permis de soulever le problème de ralentissement des récepteurs, par rapport au coefficient de diffusion observé en FRAPrv. Au contraire le glycocalyx semble peu perturber les paramètres de diffusion aux temps longs : le D_{MACRO} , pour les confinements présentant une diffusion à longue distance, et les vitesses pour les trajectoires dirigées.

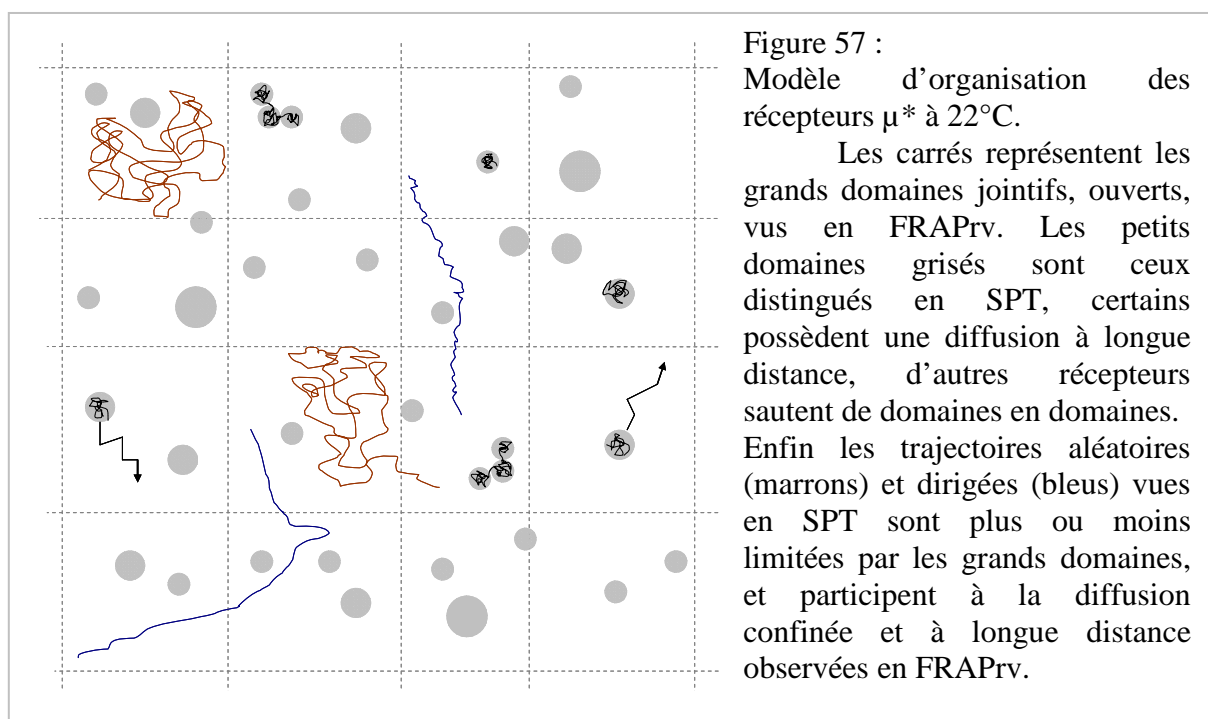
Cette différence de sensibilité entre le FRAP et le SPT avait déjà été observée dans une étude sur la mobilité des lipides, laquelle avait noté une augmentation du coefficient de diffusion après dégradation du glycocalyx uniquement en SPT (Lee, 1993).

1.1.4 – Un modèle d'organisation pour le récepteur μ^* à 22°C.

Cette étude par FRAPrv et SPT a permis d'obtenir des informations complémentaires sur l'organisation membranaire du récepteur μ^* dans les neuroblastomes. Le coefficient de diffusion obtenu dans un premier temps par SPT était environ 25 fois plus faible que celui trouvé en FRAPrv. Une différence d'un tel ordre (facteur 15) avait déjà été citée dans une étude du CMH de classe I, et considérée aberrante par les auteurs (Georgiou, 2002). Dans notre cas, il a été montré que cette variation provenait de la présence d'un glycocalyx sur la membrane plasmique qui perturbait le déplacement des colloïdes, et donc les paramètres mesurés. Une fois ce manteau de saccharides dégradé, le coefficient de diffusion moyen obtenu en SPT ($(1 \pm 1) \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$) est devenu cohérent avec celui trouvé en FRAPrv ($(8 \pm 4) \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$). En effet, le rapport entre ces deux valeurs est désormais d'environ 8, ce qui est comparable aux différences trouvées dans la littérature. Ainsi un facteur de 3 à 10 est retrouvé, toujours dans le cas des protéines de CMH I, entre ces deux techniques comparées sur le même système cellulaire (Tang, 2003). Différents lipides et protéines, suivis en systèmes modèles ou cellulaires, ont également des coefficients de diffusion environ 5 fois plus lents en SPT que par FRAP (Saxton, 1997).

Le pourcentage élevé de trajectoires présentant une diffusion dirigée soulève un problème au niveau de l'analyse en FRAP. En effet, leurs coefficients de diffusion sont trop faibles pour être mesurés par cette technique ; ils sont donc généralement considérés appartenir à la fraction immobile. Ceci ne peut pas être le cas ici. D'une part leur nombre est trop grand pour correspondre à la fraction immobile relativement faible observée en FRAP (40 % de diffusion dirigée et près de 15 % de fraction immobile en FRAP). De plus, leur vitesse non négligeable leur permet de participer au retour de fluorescence. On peut alors supposer que ces trajectoires font partie de la fraction mobile permanente observée en FRAP. L'influence de la vitesse d'une proportion de molécules sur le coefficient de diffusion calculé en FRAP reste inexplorée, et participe probablement à la différence de coefficient de diffusion observée entre ces deux techniques.

Les domaines vus en FRAP sont très différents, en taille, de ceux vus en SPT. Les particularités de chaque technique permettent d'expliquer ce problème. En effet les domaines observés en SPT, à l'exception de ceux de taille supérieure à 450 nm, sont trop petits pour être distingués en FRAP. De même les domaines vus en FRAP, compte tenu des coefficients de diffusion des récepteurs et de la durée d'acquisition des trajectoires en SPT, sont difficilement distinguables par cette technique. Nous pouvons alors imaginer un système de double compartimentation au niveau de la membrane plasmique, à partir de celui déjà décrit par les premiers résultats du FRAP. On peut y ajouter des domaines plus petits, dont certains sont capables de se déplacer à longue distance. Enfin les récepteurs présentant des trajectoires dirigées interviennent probablement dans la diffusion entre les grands domaines (fig. 57).

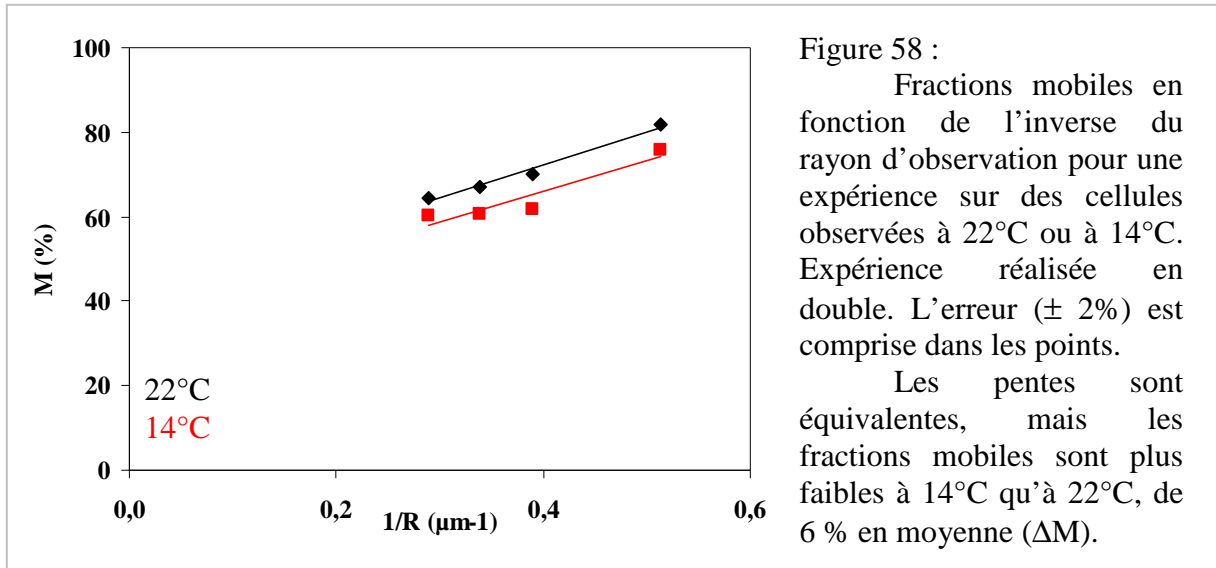


1.2 – Effet de la modulation de la température

1.2.1 – Analyse par FRAPrv

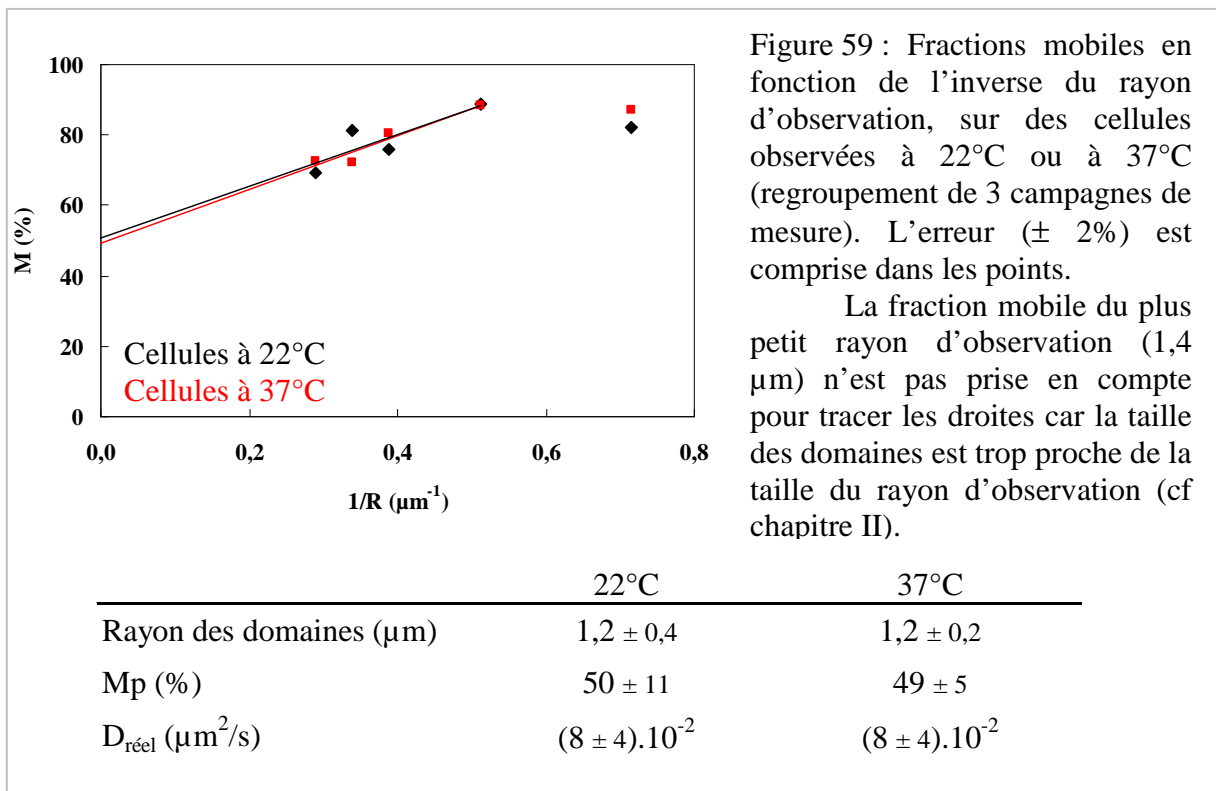
→ Diminution de la température : analyse à 14°C

Les expériences à 14°C ont été réalisées uniquement par la technique de FRAP. Elles ne montrent pas de changement ni de taille de domaines ni du coefficient de diffusion. Par contre, les fractions mobiles des récepteurs observés à 14°C sont plus faibles de 4 à 8 % que celles trouvées pour les récepteurs à 22°C (fig. 58). Cette différence est significative car systématique sur chaque rayon et à chaque expérience. Elle indique une diminution du nombre de récepteurs capables de diffuser à longue distance.



→ **Augmentation de la température : analyse à 37°C**

Les analyses ont également été réalisées à température physiologique. Les récepteurs à l'état basal ne montrent pas de modification d'organisation membranaire (fig. 59).



A 22 et à 37°C, la taille des domaines ainsi que le coefficient de diffusion des récepteurs et fraction mobile permanente sont identiques. Or, en élevant la température on pouvait s'attendre à une accélération des récepteurs due à l'agitation thermique. Cette

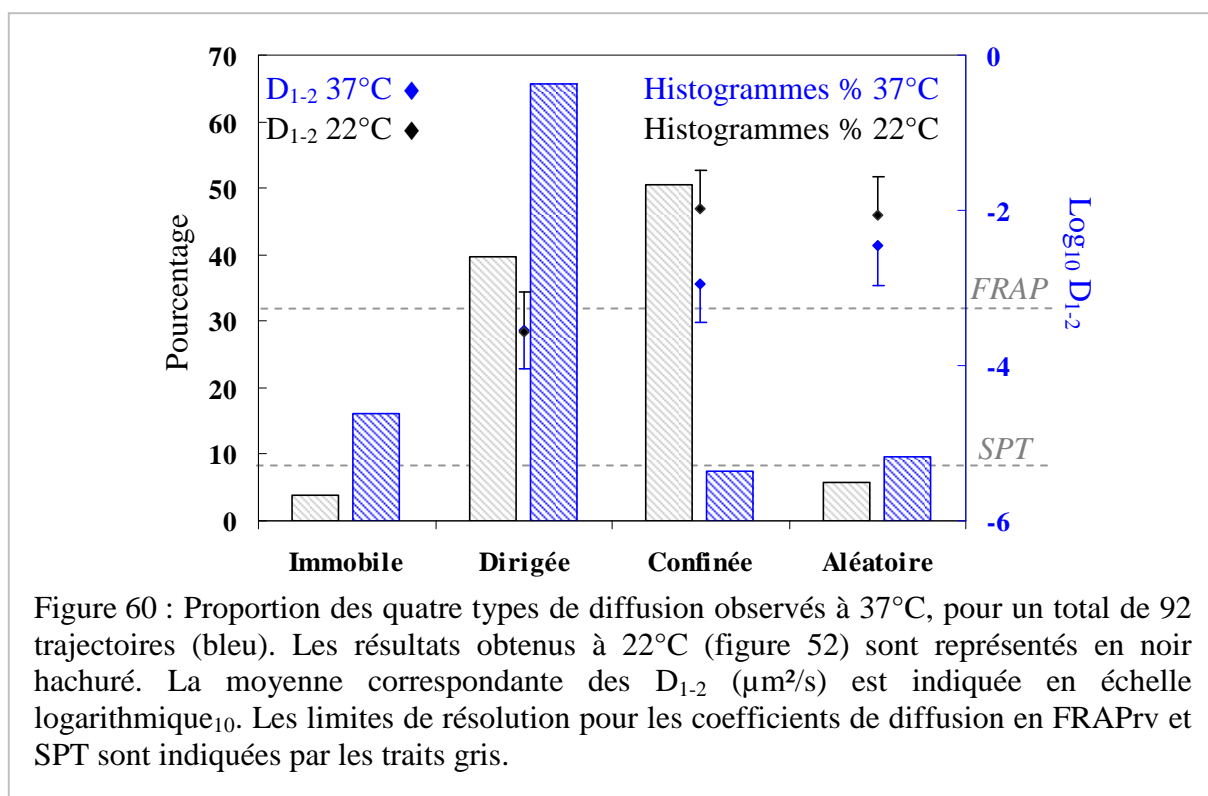
accélération n'est pas observée. Ceci laisse supposer qu'une force vient contrer cet effet, par exemple l'interaction avec une autre protéine membranaire ou cytosolique.

Afin de quantifier la modification liée à l'agitation thermique et d'analyser l'état de fluidité de la membrane, des expériences de diffusion de lipides insérés ont été réalisées à trois températures différentes et seront discutées plus loin (§1.2.3).

1.2.2 – Analyse par SPT, à 37°C

Au contraire du résultat obtenu par FRAPrv, des différences significatives sont observées entre les résultats de l'analyse en SPT à 22°C et à 37°C. A 37°C, les trajectoires de 99 colloïdes ont été enregistrées, 7 trajectoires ont été rejetées principalement à cause du déplacement de la cellule pendant le temps d'observation. Les résultats présentés ici correspondent donc à l'analyse de 92 trajectoires.

On remarque une modification des proportions de chaque type de diffusion. La proportion de trajectoires présentant une diffusion dirigée augmente de façon importante : de 40 à 66 %, au détriment des diffusions confinées, dont le taux chute de 50 à 8 % (fig. 60).



La quantité de récepteurs présentant une diffusion aléatoire reste relativement stable (6 et 10 %). Enfin on peut remarquer également un plus grand nombre de colloïdes dont la diffusion est trop lente pour être détectée et qui sont donc considérés immobiles (de 4 à

16 %). Cette augmentation est en partie liée à la résolution de l'appareillage qui est plus faible à 37°C qu'à 22°C (cf. chapitre II ; §2.4.3). De plus il est probable qu'il y ait plus de récepteurs immobilisés au niveau de la membrane, en lien avec les processus d'internalisation plus efficaces à température physiologique qu'à température ambiante.

Des modifications sont également visibles au niveau des coefficients de diffusion de chaque mode de diffusion. Les coefficients de diffusion des trajectoires dirigées sont toujours plus lents que ceux des autres types de diffusion. Néanmoins cette différence est moins marquée à 37 qu'à 22°C, puisqu'on observe un ralentissement des récepteurs présentant une diffusion autre que dirigée à 37°C (tableau 12). Ce résultat est contraire à celui qu'on pouvait attendre en considérant l'agitation thermique qui devrait entraîner une accélération de la diffusion des récepteurs à 37°C.

	Proportion (%)		D ₁₋₂ (µm ² /s)		D _{micro} (µm ² /s)	
	22°C	37°C	22°C	37°C	22°C	37°C
Immuable	4	16	-	-	-	-
Dirigée	40	66	$(2,8 \pm 3,4) \cdot 10^{-4}$	$\approx (2,8 \pm 3,1) \cdot 10^{-4}$	$(1,7 \pm 1,5) \cdot 10^{-4}$	$< (4,3 \pm 4,3) \cdot 10^{-4}$
Confinée	50	8	$(1,1 \pm 1,4) \cdot 10^{-2}$	$> (1,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-3}$	$(1,9 \pm 4,0) \cdot 10^{-2}$	$> (2,8 \pm 5,4) \cdot 10^{-3}$
Aléatoire	6	10	$(8,8 \pm 9,9) \cdot 10^{-3}$	$> (3,5 \pm 4,2) \cdot 10^{-3}$	$(7,0 \pm 7,1) \cdot 10^{-3}$	$> (1,9 \pm 1,7) \cdot 10^{-3}$

Tableau 12: Comparaison des proportions et des moyennes des coefficients de diffusion de chaque mode de diffusion à 22 (98 trajectoires) et 37°C (92 trajectoires).

Ainsi les récepteurs ayant une trajectoire confinée ou aléatoire ont un coefficient de diffusion (D₁₋₂ et D_{micro}) plus grand à 22°C qu'à 37°C. Les récepteurs présentant des trajectoires confinées ralentissent d'un facteur 8 environ, celles aléatoires d'un facteur 3. Au contraire, le coefficient de diffusion des trajectoires dirigées est identique (D₁₋₂), ou plus rapide (D_{micro}) à 37°C qu'à 22°C. Cette accélération est relativement faible, mais remarquable au vu des résultats des autres modes de diffusion. Enfin les vitesses de ces trajectoires doublent entre 22 et 37°C : de $8,3 \cdot 10^{-3}$ à $1,5 \cdot 10^{-2}$ µm/s.

Les récepteurs dont la diffusion est dirigée sont donc plus rapides à température physiologique qu'à température ambiante, tant au niveau du coefficient de diffusion qu'au niveau de leur vitesse. Au contraire, les récepteurs présentant un autre mode de diffusion sont ralentis à 37°C par rapport à 22°C.

Seules 7 trajectoires sur 92 présentent une diffusion confinée. A cette diffusion confinée est toujours associée une diffusion aléatoire à longue distance. De plus, le coefficient de diffusion à longue distance D_{MACRO} est également plus lent à 37°C qu'à 22°C (respectivement $2,0 \cdot 10^{-4}$ et $4,7 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Les rayons des domaines sont tous inférieurs à 90 nm, on ne retrouve pas de confinements de taille moyenne (100 à 250 nm) ou grande (450 à 650 nm). Le faible nombre de trajectoires présentant ce type de diffusion ne permet malheureusement pas d'analyser le lien entre le D_{1-2} et la taille des domaines, afin de confirmer ou d'infirmer la loi $D \sim L^2$. De même, la détection des sauts sur ces trajectoires n'a pas pu être faite. On peut néanmoins remarquer que le coefficient de diffusion varie bien dans le même sens que la taille des domaines (diminution des deux à 37°C par rapport à 22°C).

Les résultats obtenus en SPT montrent une modification importante liée au changement de température, tant au niveau des proportions de chaque type de diffusion, qu'au niveau des coefficients de diffusion associés. Les récepteurs ayant une diffusion dirigée semblent accélérer à 37°C (D et v), au contraire de ceux qui sont confinés, ou qui présentent une diffusion aléatoire (diminution de D_{micro} et D_{MACRO}).

L'accélération des récepteurs présentant des trajectoires dirigées est cohérente avec la vision que ce type de diffusion correspond à des molécules interagissant avec les filaments d'actine, eux-mêmes plus actifs à 37°C. Il est donc probable que ce soit effectivement le cas du récepteur μ^* . Il reste à vérifier cette hypothèse en étudiant les effets d'une déstabilisation du cytosquelette sous-membranaire d'actine sur les trajectoires dirigées. De plus il faudra déterminer si cette interaction est directe ou est réalisée par l'intermédiaire d'autres protéines, par exemple la filamine (Onoprishvili, 2003).

On peut supposer que le ralentissement des récepteurs ayant un autre type de diffusion est dû à un encombrement plus grand de la membrane à 37°C. En effet, il est probable que le trafic des protéines (montée à la membrane et également endocytose constitutive) soit plus efficace à température physiologique qu'à 22°C. Dans ce cas, le nombre de protéines présentes à la membrane, ou dans l'environnement sous membranaire proche, est plus grand et peut causer une gêne stérique au déplacement des constituants membranaires. De même si on considère que le cytosquelette est plus actif à 37°C qu'à 22°C, son influence sur la diffusion est probablement plus importante à cette température. Dans les deux cas il s'agit d'un encombrement plus important de l'environnement proche du récepteur qui ralentit sa diffusion.

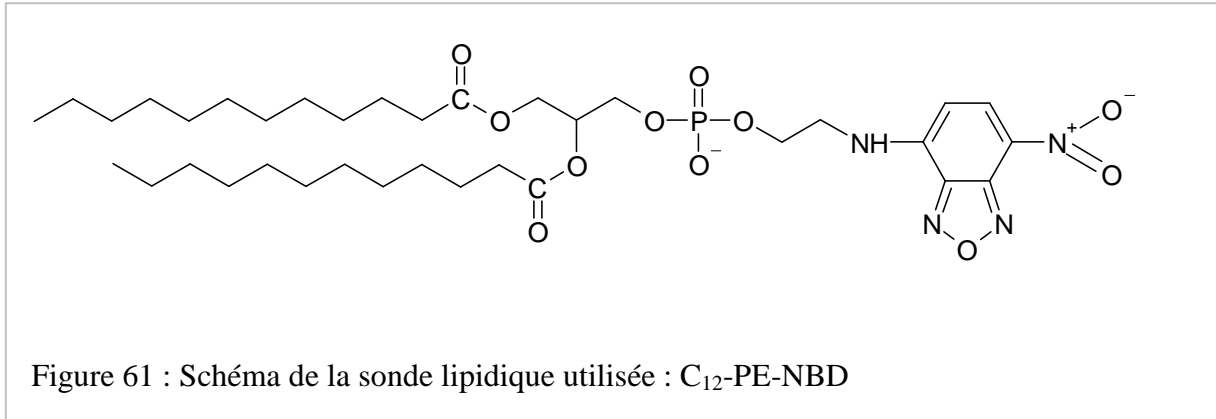
Des résultats obtenus par FRAP sur les récepteurs à la vasopressine ne vont pas dans le même sens que nos observations. En effet, le coefficient de diffusion des récepteurs V1 (Jans, 1990) et V2 (Jans, 1989) augmentent avec la température. Néanmoins nos résultats sont comparables avec ceux observés précédemment pour le récepteur T7-hMOR exprimé dans des NRK (Daumas, 2003a). En effet une accélération des récepteurs présentant une diffusion dirigée, et un ralentissement des récepteurs confinés, ont été observés à 37°C par rapport à 22°C. De même la taille des domaines est plus petite à 37°C qu'à 22°C (Daumas, 2003a). Une autre étude a montré que l'augmentation de la température de 25°C à 37°C entraîne un ralentissement de deux protéines transmembranaires, observées en FCS. De plus dans cette même étude, l'influence du cytosquelette sur la diffusion des protéines membranaires est moindre à 25°C qu'à 37°C, ce qui est cohérent avec les résultats présentés ici (Wawrezinieck, 2006).

Ces résultats indiquent que le rôle de la température sur la diffusion des constituants membranaires est probablement plus complexe que supposé, et ne se réduit pas à une augmentation de l'agitation thermique. De plus il est possible que l'influence de la température soit différente en fonction de la protéine étudiée. Enfin la technique utilisée joue également un rôle dans la détection ou non, de ces perturbations qui peuvent être faibles. Ceci est notamment visible dans notre cas où l'accélération de certains récepteurs vient compenser le ralentissement des autres, ce qui entraîne une absence de changement significatif du coefficient de diffusion moyen mesuré par FRAPrv entre 37°C et 22 C.

1.2.3 – Diffusion de sondes lipidiques, analyse par FRAPrv

Afin d'avoir une vue plus complète de la membrane plasmique dans laquelle les récepteurs évoluent, des sondes lipidiques fluorescentes (C₁₂-PE-NBD, fig. 61) ont été insérées dans la membrane plasmique et leur diffusion analysée en FRAPrv. Les acides gras en C₁₂ facilitent l'insertion des lipides dans la membrane. Le fluorophore fixé sur la tête polaire permet d'éviter une interaction du NBD avec le cœur de la membrane, tout en empêchant la reconnaissance du lipide par des protéines d'échange ce qui entraînerait son internalisation. Le protocole mis au point utilise un marquage (insertion des lipides dans la membrane) à température ambiante afin de limiter la perturbation induite sur la cellule, et non à 4°C comme cela est classiquement réalisé. Aucune internalisation de la sonde n'est observée, ni à 22°C ni à 37°C, au bout des 30 minutes nécessaires à la prise de mesure. La

diffusion de la sonde a été mesurée, en FRAPrv, aux trois températures utilisées pour l'analyse du récepteur : 14°C, 22°C et 37°C.



→ Résultats

Quelle que soit la température d'observation, la fraction mobile reste constante en fonction du rayon et est comparable pour les trois températures testées : 80,4 ± 3,2 % (14°C), 81,8 ± 2,3 % (22°C) et 76,8 ± 1,8 % (37°C). Bien que la valeur obtenue à 37°C soit légèrement plus faible que dans les deux autres cas, cette différence n'est pas significative car elle n'est pas systématique à chaque expérience et à chaque rayon.

De même, les coefficients de diffusion obtenus ne varient pas avec la taille de la zone d'observation ce qui indique une absence d'organisation en domaines. Néanmoins les coefficients de diffusion augmentent avec la température : 0,8 ± 0,2 μm²/s (14°C) ; 1,0 ± 0,2 μm²/s (22°C) et 1,4 ± 0,2 μm²/s (37°C). Cette différence, bien que faible, est significative. Elle est retrouvée systématiquement à chaque expérience et à chaque rayon d'observation. De plus cette augmentation suit la loi d'Arrhenius :

$$D = Ae^{\left(\frac{-Ea}{RT}\right)} \quad (\text{Eq. 26}).$$

Où A est une constante, Ea l'énergie d'activation, R la constante des gaz parfaits et T la température. L'énergie d'activation, calculée à partir de la pente de $\text{Log } D = f(1/T)$, est de l'ordre de 7,8 kJ / mol. Cette valeur est cohérente avec celles obtenues pour des lipides diffusant dans une membrane modèle (Derzko, 1980 ; Vaz, 1982a) ou recalculée à partir des données d'une sonde lipidique insérée dans la membrane plasmique de cellules (LLC-PK) obtenue par Jans *et coll.* (Jans, 1990), qui est d'environ 14 kJ / mol. Il est à noter que peu

d'informations existent dans la littérature sur la diffusion latérale d'un analogue lipidique analysée à différentes températures dans une membrane biologique.

L'absence de variation de la fraction mobile et des coefficients de diffusion en fonction du rayon d'observation indique que le C₁₂-PE-NBD suivi n'est pas compartimenté dans des domaines à la surface de la cellule. De plus, ces résultats montrent une fraction immobile de l'ordre de 20 %. Une telle valeur de la fraction immobile a déjà été décrite pour des lipides insérés dans la membrane plasmique de cellules (Cézanne, 2004 ; Lee, 1993 ; Struck, 1980) et reste à ce jour inexplicée. Une hypothèse proposée serait l'existence d'agrégats de lipides comprenant, ou non, des protéines au sein de la membrane (Dupou, 1988 ; Vergne, 1999). Il faut noter néanmoins que dans certaines études cette fraction immobile n'est pas retrouvée : elle est parfois inexistante (Jans, 1989) ou plus importante (Metcalf, 1986 ; Schootemeijer, 1995).

→ Comparaison avec la littérature

Les valeurs de coefficient de diffusion lipidiques obtenues mettent en évidence le fait que la membrane plasmique reste en phase fluide quelle que soit la température utilisée dans cette étude. Ces valeurs semblent, au premier abord, plus grandes que celles classiquement trouvées dans la littérature. Ainsi des données obtenues précédemment dans l'équipe : 0,1 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour une sonde C₆-NBD-PC insérée dans des membranes de CHO (Vergne, 1999), ou plus récemment 0,2 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ pour la même sonde dans des membranes de HEK (Cézanne, 2004). De telles valeurs sont retrouvées pour différentes sondes insérées dans des membranes de CHO ou métabolisées dans ces mêmes cellules (Dupou, 1988). D'autres équipes ont également obtenu des coefficients de diffusion de même ordre (Struck, 1980 ; Yechiel, 1987). Néanmoins des études récentes analysant la diffusion de lipides dans des membranes plasmiques indiquent des valeurs proches de 1 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ (à 37°C), comparables à celles obtenues ici (Fujiwara, 2002 ; Lee, 1993 ; Lenne, 2006).

Ces différences peuvent probablement être expliquées par la nature des sondes utilisées, en particulier la localisation (chaîne d'acide gras ou tête polaire) et la taille du groupement fluorescent, qui peuvent être plus ou moins perturbantes. Les conditions d'incubation et d'observation utilisées sont également souvent différentes, la plupart des études sont faites après une incubation des cellules à 4°C (Cézanne, 2004 ; Struck, 1980 ;

Vergne, 1999 ; Yechiel, 1987), à l'opposé de notre protocole ou d'autres (Fujiwara, 2002 ; Lee, 1993).

Nous avons vu dans l'introduction (cf §3.2) que différentes études révèlent des comportements diffusionnels différents en fonction des lipides testés, du type cellulaire, ou bien de la technique utilisée. Dans notre cas l'analogue lipidique n'est pas compartimenté dans la membrane des neuroblastomes, quelle que soit la température d'observation. Afin de compléter ce résultat il serait intéressant de suivre la diffusion d'un autre lipide (notamment avec des chaînes d'acides gras insaturées) et également de faire une étude en SPT.

Nos résultats révèlent donc une diffusion des analogues lipidiques différente de celle du récepteur μ^* dans la même membrane : d'une part ils ne sont pas compartimentés dans des domaines, d'autre part leur coefficient de diffusion est plus grand (un facteur 10 environ)

1.2.4 – Un modèle d'organisation pour le récepteur μ^* à 37°C

Ces résultats mettent en évidence un effet de la température d'observation sur la dynamique et l'organisation du récepteur μ^* dans la membrane des neuroblastomes. En FRAPrv, une diminution de la proportion de récepteurs capables de diffuser à longue distance est observée quand les cellules sont placées à 14°C. On peut supposer que le cytosquelette est moins actif à cette température plus faible, ce qui ralentit les récepteurs qui interagissent avec lui. En suivi de particule unique, de tels récepteurs présentent des trajectoires dirigées. Ce résultat est donc cohérent avec l'hypothèse que la fraction mobile permanente visible en FRAP correspondrait à des récepteurs ayant une diffusion dirigée en SPT. En abaissant la température la vitesse des trajectoires dirigées doit être plus faible, et la diffusion à longue distance également.

En dehors de cette différence de fraction mobile permanente, l'analyse en FRAPrv ne montre pas de variations entre les trois températures testées : les tailles de domaines et les coefficients de diffusion sont identiques. Cette invariance amène aussi d'autres questions. En effet, l'observation des lipides diffusant dans le feuillet externe de la membrane montre une augmentation du coefficient de diffusion avec l'augmentation de la température. La stabilité observée dans le cas des récepteurs est donc probablement le reflet de l'existence de deux

effets opposés : d'une part l'agitation thermique, d'autre part l'interaction du récepteur avec d'autres constituants encore non identifiés.

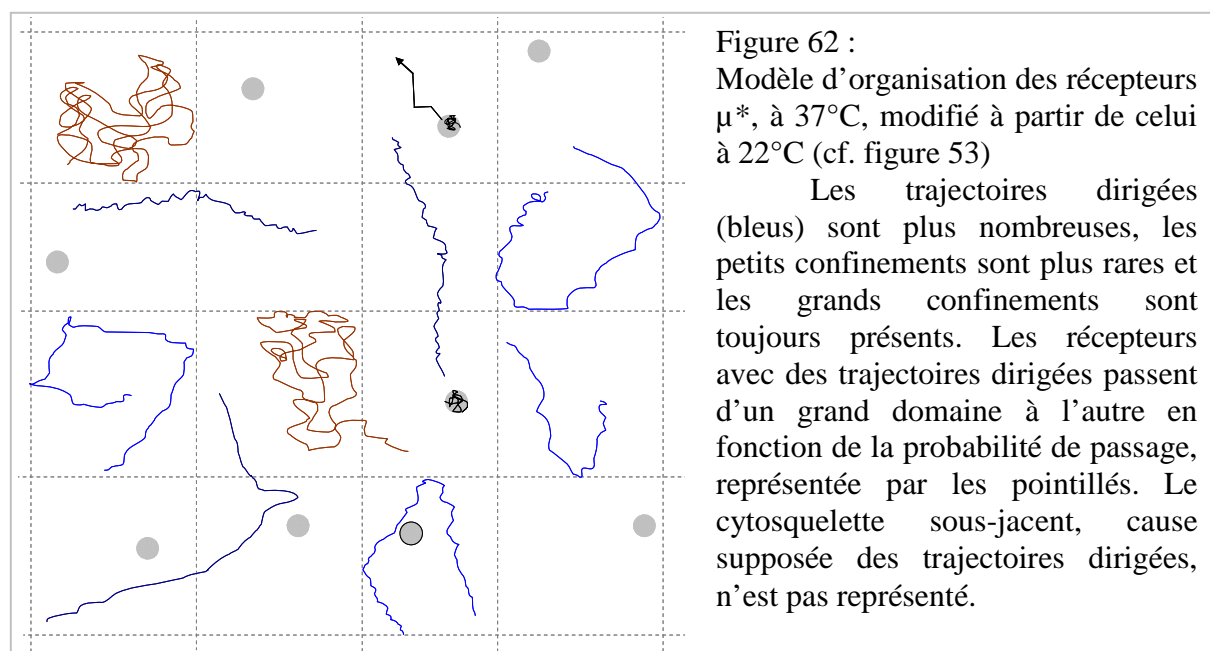
Des modifications importantes lors du passage de 22°C à 37°C, sont révélées en suivi de particule unique. Tout d'abord les proportions de chaque type de diffusion changent. Les trajectoires dirigées deviennent majoritaires (66 %) et les récepteurs immobiles constituent la deuxième population (16 %). Cette augmentation des récepteurs immobiles, partiellement expliquée par une résolution plus faible, est concordante avec le ralentissement des récepteurs présentant une diffusion autre que dirigée (18 %). On observe donc que près d'un tiers des récepteurs ralentissent, certains jusqu'à devenir immobiles, alors que les deux autres tiers présentent une diffusion un peu plus rapide, et surtout un doublement de leur vitesse.

A 37°C, les trajectoires dirigées présentent surtout une augmentation de leur vitesse. On peut supposer qu'elle est due à une interaction avec le cytosquelette, qui est plus actif à 37°C qu'à 22°C (Anson, 1992). Le ralentissement observé en SPT pour les récepteurs ayant un autre mode de diffusion pose la question de l'environnement de ces protéines. En effet les lipides incorporés dans le feuillet externe de la membrane plasmique se comportent comme en système modèle, c'est-à-dire accélèrent lorsque la température augmente. On peut donc émettre l'hypothèse que le ralentissement des récepteurs est dû à un encombrement plus grand de la membrane et de son environnement cytoplasmique proche, en lien avec un turn-over des protéines membranaires plus efficace à 37°C.

Les résultats obtenus à 22°C pour les récepteurs présentant une diffusion confinée, et en particulier la variation de D en fonction de L^2 , permettent de supposer que ces confinements sont dus à des interactions à longue distance entre protéines. Néanmoins des analyses complémentaires indiquent que la diffusion à longue distance observée pour ces confinements serait due à des sauts entre domaines. Dans tous les cas la quasi-disparition de ce type de diffusion à 37°C au profit des diffusions dirigées, permet d'imaginer que ces regroupements correspondraient à des récepteurs pas encore liés au cytosquelette, mais dont la rencontre avec ce dernier serait favorisée par l'augmentation de la température.

Les résultats obtenus à 37°C en FRAP et en SPT semblent décrire deux organisations différentes. Bien que les trajectoires aléatoires obtenues en SPT puissent correspondre à des récepteurs diffusant dans les grands domaines vus en FRAP, elles ne sont pas assez

nombreuses pour expliquer ces résultats. Nous avons déjà soulevé le lien entre les trajectoires dirigées et la fraction mobile permanente. Néanmoins la forte proportion de ces trajectoires à 37°C soulève un problème entre les deux techniques. L'influence de ces trajectoires sur le retour de fluorescence, mais également sur les coefficients de diffusion calculés à partir de ces retours devient dès lors une question majeure. On peut également imaginer que ces récepteurs, malgré leur diffusion dirigée, soient limités dans les grands domaines vus en FRAPrv. Dans ce cas, la fraction mobile permanente serait toujours due à la probabilité de passage entre les domaines de ces récepteurs, exactement de la même manière que s'ils étaient libres de diffuser dans les domaines (fig. 62). Cette hypothèse soulève également deux origines d'organisation membranaires : l'une liée au cytosquelette, s'il est confirmé que les récepteurs dont les trajectoires sont dirigées interagissent avec lui, l'autre responsable des grands domaines, dont l'origine reste à déterminer.



Le manque de données dans la littérature sur les protéines présentant des trajectoires dirigées ne facilite pas l'explication des phénomènes observés ici. En effet, quelques études existent sur ce type de diffusion (Sergé, 2003), mais elles ne comparent pas les techniques d'observation. La question se pose alors de savoir comment ces trajectoires dirigées sont perçues par les autres techniques d'analyse de diffusion, en particulier le FRAPrv. Il serait également intéressant d'analyser la diffusion du récepteur en SPT à 14°C afin d'affiner le lien entre la fraction mobile permanente et les trajectoires dirigées. De plus ces observations

permettraient peut être de mieux comprendre l'influence de la température sur les confinements observés à 22°C.

Ces analyses à différentes températures ont apporté des informations sur l'organisation de μ . Néanmoins les domaines observés, ainsi que les différents types de trajectoires, ne sont pas encore reliés à une origine biologique, ou à un modèle d'organisation membranaire. Afin de comprendre la ou les causes de cette organisation, nous nous sommes donc intéressés aux effets de la déstabilisation du cytosquelette d'actine.

1.3 – Influence du cytosquelette d'actine sur la diffusion de μ^*

Nous avons vu précédemment (cf. chapitre I, §3.2.2) que le cytosquelette d'actine sous-membranaire est considéré comme une source importante de confinement possible. Les tailles de domaines observées correspondent à la maille du réseau d'actine, et peuvent aller de 100 nm à 1 μm (Kusumi, 1996). De ce fait, il peut être un bon candidat pour expliquer les grands domaines observés en FRAPrv (1 μm de rayon) mais également les petits domaines observés en SPT à température ambiante. Enfin il est essentiel de vérifier l'hypothèse d'un lien entre les récepteurs ayant des trajectoires dirigées et les filaments d'actine.

1.3.1 – Etude en fonction de la température par FRAPrv

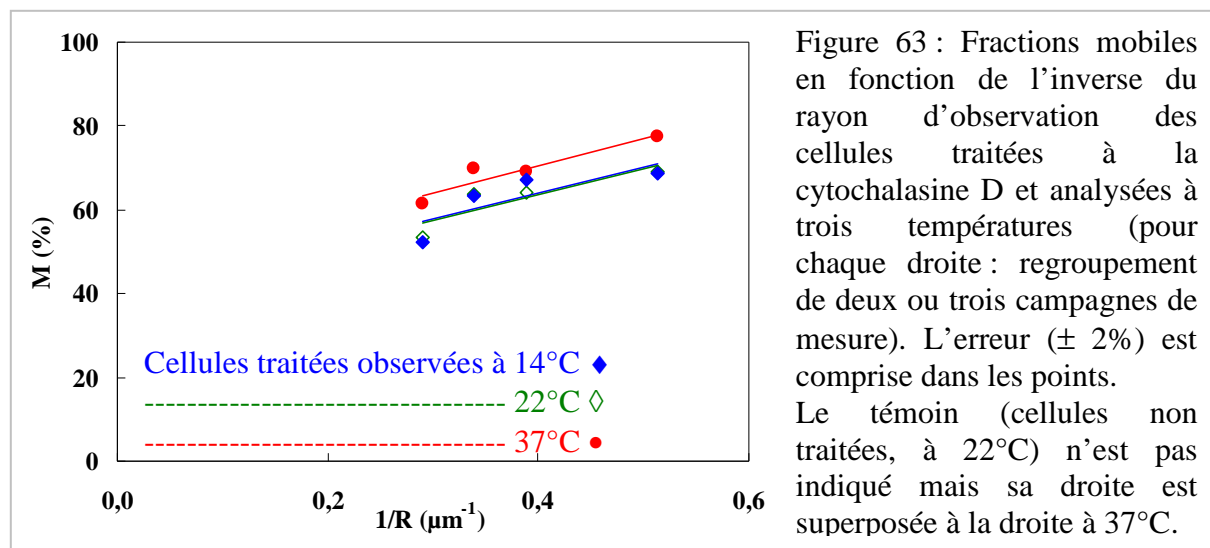
Les cellules traitées à la cytochalasine D (30 minutes à 5 μM et à 37°C), c'est-à-dire ayant leur cytosquelette d'actine sous-membranaire majoritairement détruit, ont été analysées en FRAPrv aux trois températures précédemment étudiées. L'analyse des fractions mobiles et des coefficients de diffusion en fonction du rayon d'observation démontre une compartimentation des récepteurs μ^* . Les paramètres obtenus sont présentés dans le tableau 13 ci-dessous.

	CytoD 14°C	CytoD 22°C	CytoD 37°C	Témoin 22°C
Rayon des domaines (μm)	$1,0 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$
$D_{\text{réel}}$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	$(6 \pm 6).10^{-2}$	$(6 \pm 5).10^{-2}$	$(6 \pm 4).10^{-2}$	$(8 \pm 4).10^{-2}$
ΔM :				
Comparé au témoin à 22°C	-	$6,0 \pm 0,5$	-	-
Comparé à CytoD à 22°C	$-0,3 \pm 1,5$	-	$-6,9 \pm 1,5$	-

Tableau 13 : Comparaison des paramètres obtenus en FRAPrv, sur cellules traitées à la cytochalasine D et observées à trois températures différentes. ΔM correspond à la variation moyenne de la fraction mobile de la condition testée par rapport au témoin cité : $\Delta M = M_{\text{témoin}} - M_{\text{condition testée}}$.

On peut remarquer que l'erreur est un peu plus grande pour les cellules traitées que pour les cellules témoins. En effet le traitement appliqué perturbe les cellules et entraîne le rejet de plus de retours de fluorescence.

Ni les tailles de domaines, ni les coefficients de diffusion ne sont modifiées entre les cellules traitées à la cytochalasine D et les cellules témoins. On observe néanmoins une modification de la fraction mobile à chaque rayon (ΔM , tableau 13) qui ne modifie pas la taille des domaines, mais entraîne une diminution de la fraction mobile permanente. Ainsi, à température ambiante, la destruction du cytosquelette d'actine entraîne une diminution de 6 % de M_p par rapport à ces cellules non perturbées. La diminution de température (14°C) ne modifie pas la proportion de récepteurs capables de diffuser à longue distance par rapport aux cellules traitées observées à 22°C. Au contraire, l'augmentation de la température d'observation à 37°C permet de faire augmenter de nouveau M_p de 7% environ, ce qui ramène ces valeurs au niveau de celles des cellules témoins. Les pentes des fractions mobiles en fonction de l'inverse du rayon d'observation, aux trois températures, ne sont pas modifiées, mais les droites 37°C et 14°C / 22°C sont translatées (fig. 63). Le témoin non traité à 22°C (ou à 37°C) se situe aux mêmes valeurs que les cellules traitées observées à 37°C.



La destruction d'une grande proportion des filaments d'actine entraîne finalement peu de modifications de l'organisation du récepteur μ^* . Ce résultat indique que les grands domaines observés ne sont sans doute pas induits par le réseau sous-membranaire des filaments d'actine. Seule une diminution assez faible de la fraction mobile permanente est observée à température ambiante.

Le traitement à la cytochalasine D n'induit pas de modifications de la diffusion des récepteurs par rapport à des cellules au cytosquelette intact lorsque l'étude est menée à 14°C. En effet ces dernières présentent déjà une fraction mobile permanente plus faible d'environ 6 % qu'à température ambiante. La comparaison des cellules traitées ou non, à la même température, met donc en évidence une absence de modification de la proportion de récepteurs diffusant à longue distance.

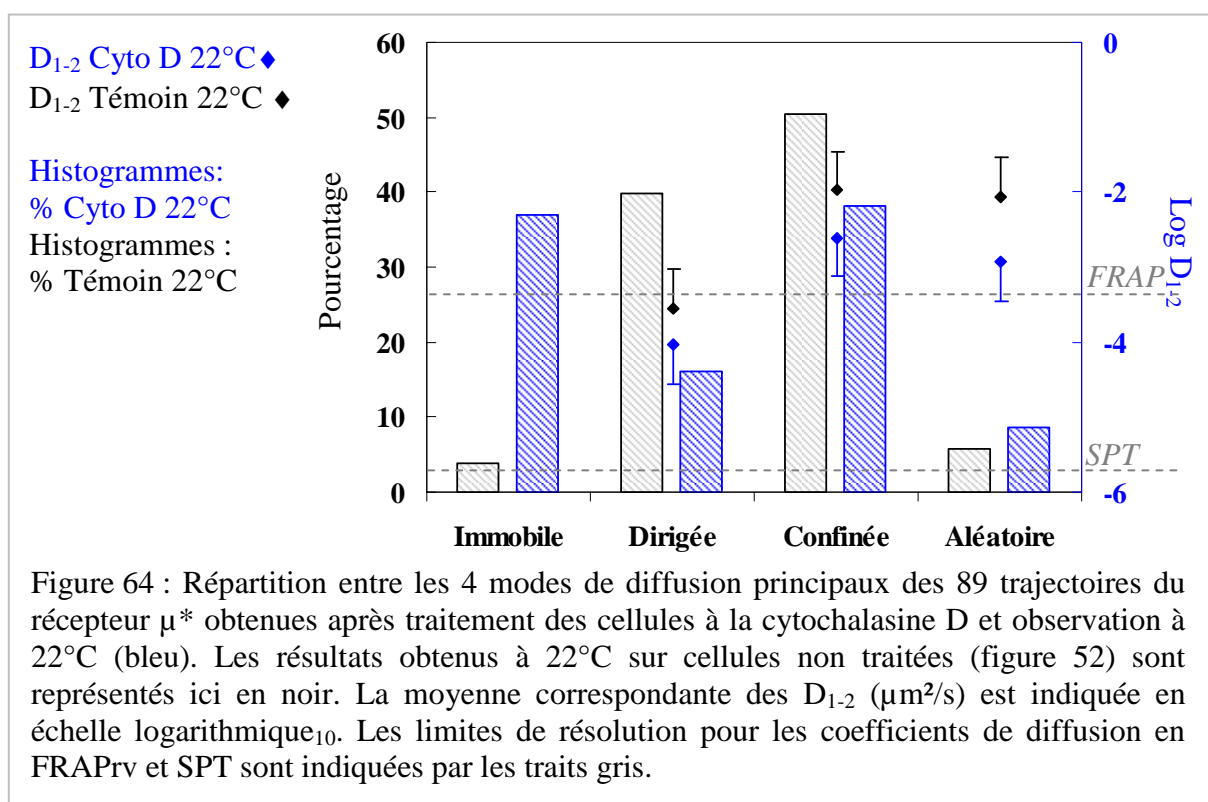
Enfin les cellules traitées à la cytochalasine D et observées à 37°C ont le même pourcentage de récepteurs diffusant à longue distance obtenu à température ambiante dans le cas de cellules non traitées. De même qu'à 14°C, les fractions mobiles des récepteurs diffusant à 37°C sont invariantes entre cellules traitées et cellules témoins.

En conclusion, la destruction du cytosquelette cortical ne modifie ni la taille des domaines, ni le coefficient de diffusion des récepteurs. Elle a un faible effet sur les récepteurs diffusant à longue distance, uniquement lorsque les cellules sont maintenues à 22°C pendant la durée des expériences. Le cytosquelette d'actine semble donc ne pas pouvoir être retenu comme responsable de l'organisation en grands domaines perméables des récepteurs μ^* . Afin

de confirmer ce résultat il serait souhaitable d'étudier les effets d'autres drogues contre le cytosquelette, en particulier contre le réseau de microtubules.

1.3.2 – Etude à température ambiante par SPT

Les effets de la destruction du cytosquelette d'actine par la cytochalasine D ont également été suivis par SPT, à température ambiante uniquement. 89 trajectoires ont été enregistrées, dont trois ont été rejetées après analyse. Les conséquences de l'absence du réseau d'actine sur la diffusion des récepteurs sont plus visibles que lors de l'étude par FRAPPrv. Dans un premier temps les proportions de chaque mode de diffusion, et les coefficients de diffusion moyens correspondants sont indiqués en figure 64.



La différence la plus importante réside dans l'augmentation du nombre de récepteurs immobiles : de 4 à 37 %. Au contraire les trajectoires dirigées diminuent de 40 à 18 % et les trajectoires confinées de 50 à 37 %. Les trajectoires aléatoires restent en quantité similaire, si bien que l'augmentation de récepteurs immobiles se fait exclusivement au détriment des récepteurs ayant des trajectoires dirigées ou confinées.

Dans le même temps les coefficients de diffusion de tous les récepteurs diminuent, tout en conservant les trajectoires dirigées comme les trajectoires les plus lentes. Sur l'ensemble des trajectoires, le coefficient de diffusion est diminué par un facteur 5 environ (de

$6,5 \cdot 10^{-3}$ à $1,2 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Un ralentissement équivalent est constaté au sein de chaque mode de diffusion (tableau 14) et existe en proportion comparable au niveau du D_{1-2} et du D_{micro} . Ce dernier point indique que le D_{1-2} est toujours bien corrélé avec le D_{micro} , ce qui a de plus été vérifié par l'alignement de ces deux paramètres sur une droite de pente égale à 0,98.

	Proportion (%)		$D_{1-2} (\mu\text{m}^2/\text{s})$		$D_{\text{micro}} (\mu\text{m}^2/\text{s})$	
	22°C	CytoD	22°C	CytoD	22°C	CytoD
Immobile	4	37	-	-	-	-
Dirigée	40	18	$(2,8 \pm 3,4) \cdot 10^{-4}$	$(9,1 \pm 9,3) \cdot 10^{-5}$	$(1,7 \pm 1,5) \cdot 10^{-4}$	$(6,6 \pm 3,2) \cdot 10^{-5}$
Confinée	50	37	$(1,1 \pm 1,4) \cdot 10^{-2}$	$(2,5 \pm 3,7) \cdot 10^{-3}$	$(1,9 \pm 4,0) \cdot 10^{-2}$	$(8,1 \pm 9,9) \cdot 10^{-3}$
Aléatoire	6	9	$(8,8 \pm 9,9) \cdot 10^{-3}$	$(1,2 \pm 2,2) \cdot 10^{-3}$	$(7,0 \pm 7,1) \cdot 10^{-3}$	$(4,8 \pm 7,4) \cdot 10^{-4}$

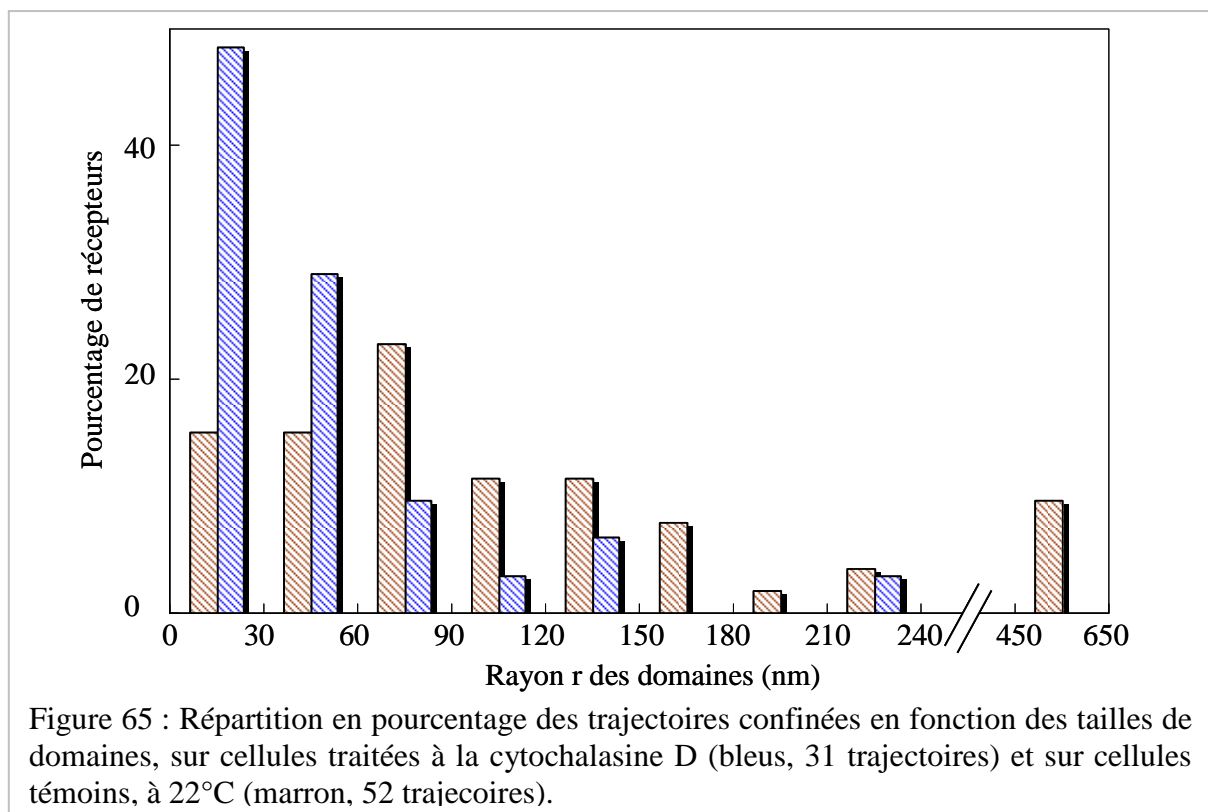
Tableau 14 : Comparaison des proportions et des coefficients de diffusion moyens D_{1-2} et D_{micro} pour les trajectoires obtenues sur cellules témoins et sur cellules dont le cytosquelette a été détruit, observation à 22°C.

Enfin ce ralentissement est également perceptible sur les paramètres de diffusion à longue distance puisque la vitesse moyenne des récepteurs ayant une diffusion dirigée diminue ($8,3 \cdot 10^{-3}$ à $4,7 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}/\text{s}$). Le coefficient de diffusion macroscopique D_{MACRO} de ceux présentant une diffusion confinée superposée à une diffusion à longue distance diminue également (de $4,8 \cdot 10^{-4}$ à $9,9 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$).

Ces résultats démontrent une importance du cytosquelette cortical à température ambiante sur la diffusion des récepteurs. Dans un premier temps, les récepteurs présentant des trajectoires dirigées semblent bien être en interaction avec ce cytosquelette puisque la destruction de ce dernier entraîne une diminution de leur nombre. On pouvait s'attendre à une augmentation du nombre de récepteurs ayant une diffusion aléatoire, avec un coefficient de diffusion plus élevé. Au contraire, les récepteurs qui ne suivent plus une diffusion dirigée sont immobilisés. Il est possible que les récepteurs soient toujours en interaction avec l'actine sous-membranaire, mais que cette dernière soit elle-même immobilisée.

Quatre trajectoires ne sont pas prises en compte dans ces moyennes, car elles présentent des diffusions dirigées très rapides ($D_{1-2} = 1,2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Il serait nécessaire d'acquérir plus de trajectoires pour déterminer s'il existe réellement une population de récepteurs avec une diffusion de type dirigée très rapide. On peut noter toutefois qu'aucune trajectoire de ce type n'a été distinguée lors de l'étude des cellules témoins.

Dans un deuxième temps, on peut remarquer que le nombre de trajectoires confinées diminuent également, en corrélation avec un ralentissement important des récepteurs. Les trajectoires qui subsistent sont majoritairement des récepteurs présentant un confinement à court terme combiné à une diffusion à longue distance (27 trajectoires pour 4 strictement confinées) dont la majorité se trouve dans des domaines de rayon inférieur à 90 nm (fig. 65).



Les domaines de petites tailles deviennent majoritaires lorsque le cytosquelette cortical est détruit. Il semblerait donc que les domaines de tailles intermédiaires (90-250 nm) soient plus affectés que ceux de taille inférieure. Le nombre de récepteurs dans les plus grands confinements (450-650 nm) est trop faible, sur cellules témoins, pour pouvoir en tirer une conclusion quand à la diminution réelle du nombre de récepteurs.

Plus de la moitié de ces trajectoires ont des tailles de confinements plus faibles que la résolution de notre analyse ou ne respecte pas l'équation 25, ce qui indique que ces valeurs sont entachées de plus de 10 % d'erreur. Il ne reste donc que 13 trajectoires pour faire l'analyse de la variation du D_{1-2} en fonction des tailles de domaines, ce qui est trop faible. On ne peut donc pas conclure sur la validité de la relation $D \sim L^2$ pour ces trajectoires, mais notons cependant qu'à la fois les coefficients de diffusion et les tailles de domaines diminuent.

1.3.3 – Comparaison des résultats et modèle d'organisation.

Les cellules dont le cytosquelette sous-membranaire d'actine est détruit de manière importante montrent donc des comportements diffusionnels différents des récepteurs observés en SPT lorsque le cytosquelette d'actine est intact. A la fois les proportions des différents modes de diffusion et leurs paramètres sont modifiés.

De manière générale, on observe un ralentissement global des récepteurs. Ce ralentissement va jusqu'à causer l'immobilisation de près d'un tiers d'entre eux. Il peut être dû d'une part à la liaison des récepteurs avec l'actine, qui n'est plus en mouvement, d'autre part à la gêne stérique causée par la présence d'actine désorganisée proche de la membrane.

Ce ralentissement, et en particulier l'augmentation de récepteurs immobiles, est cohérent avec la diminution de la fraction mobile permanente vue en FRAP. Néanmoins, les proportions de ces deux phénomènes ne sont pas du même ordre, seule la diffusion de 10% environ des récepteurs est modifiée en FRAP_{Prv}, alors que l'augmentation du nombre de récepteurs immobiles est de l'ordre de 30 % de la population en SPT.

La diffusion des lipides a également été observée après ce traitement, et n'est pas modifiée ni au niveau de la fraction mobile, ni au niveau du coefficient de diffusion (fig. 69). Ceci indique que la diffusion du récepteur μ^* est affectée de manière directe, et non par une perturbation indirecte de la membrane.

Le cytosquelette semble donc jouer un rôle dans les confinements observés en SPT, principalement au niveau de ceux de taille intermédiaire (100 à 250 nm). De même sa déstructuration entraîne une diminution importante du nombre de trajectoires dirigées. Ceci indique qu'il influence la diffusion des récepteurs présentant ce mode de diffusion. Par contre il n'est pas à l'origine des grands confinements observés en FRAP_{Prv}. Ces résultats démontrent donc différentes causes impliquées dans la diffusion des récepteurs μ^* dans la membrane des neuroblastomes. Des interactions à longue distance inter-protéines seraient impliqués pour les récepteurs présents dans des domaines inférieurs à 250 nm. Le cytosquelette cortical serait à l'origine des diffusions dirigées de certains récepteurs. Enfin une troisième cause encore non déterminée entraîne la compartimentation des récepteurs dans des grands domaines.

1.4 – Influence des protéines G sur la diffusion de μ^* : étude en fonction de la température par FRAPrv

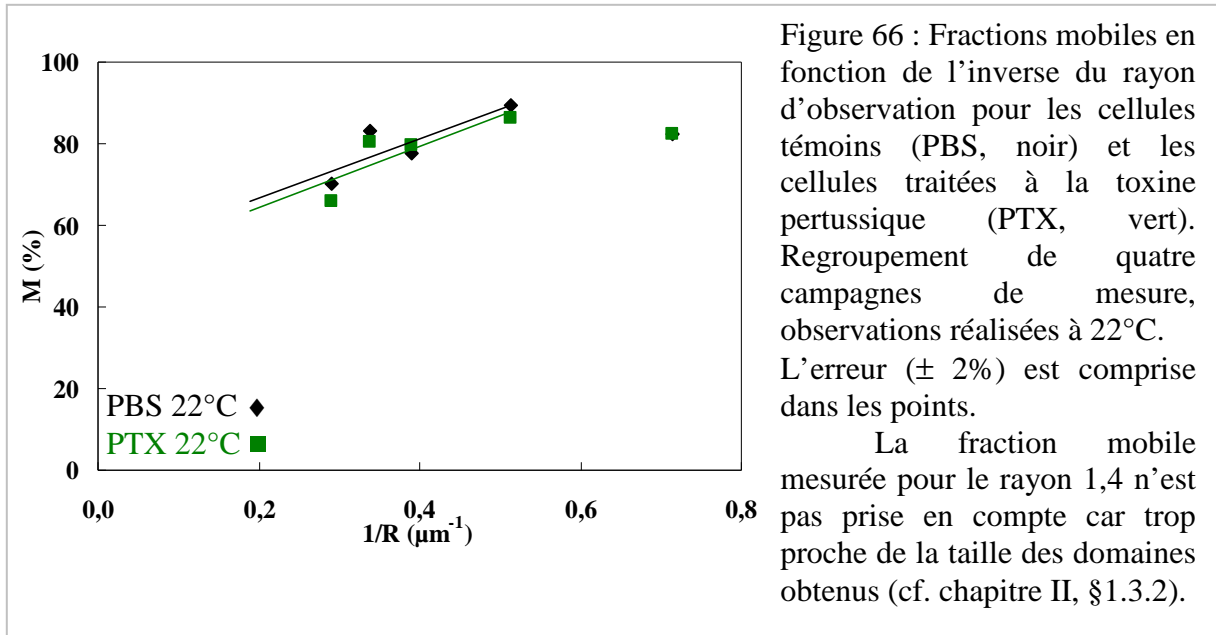
L'influence des protéines G, partenaires essentiels des récepteurs à sept segments transmembranaires, sur la dynamique du récepteur μ^* a été étudiée. Par manque de temps cette analyse n'a pu être réalisée que par la technique de FRAPrv. Les cellules sont traitées à la toxine pertussique pendant une nuit, ce qui entraîne l'ADP-ribosylation des protéines $G_{\alpha i}$ et empêche leur interaction avec les récepteurs. En cas de pré-couplage des protéines G avec les récepteurs, la durée du traitement implique que ce pré-couplage n'est plus présent au moment de l'expérience. Les observations ont été faites aux trois températures précédemment étudiées.

1.4.1 – Dynamique des récepteurs μ^* à 22°C

Dans un premier temps la dynamique des récepteurs dans les cellules traitées à la toxine pertussique a été comparée à celle des récepteurs dans des cellules non traitées à température ambiante (22°C). Les résultats ne montrent pas de modification de l'organisation latérale du récepteur μ^* , ni en terme de taille de domaines ni en terme de coefficient de diffusion (tableau 15). De plus, il n'y a aucune différence au niveau des fractions mobiles, et donc au niveau de la fraction mobile permanente M_p (fig. 66). Cette analyse à 22 °C va nous servir de référence pour les analyses réalisées aux deux autres températures d'observation sur cellules traitées à la toxine pertussique.

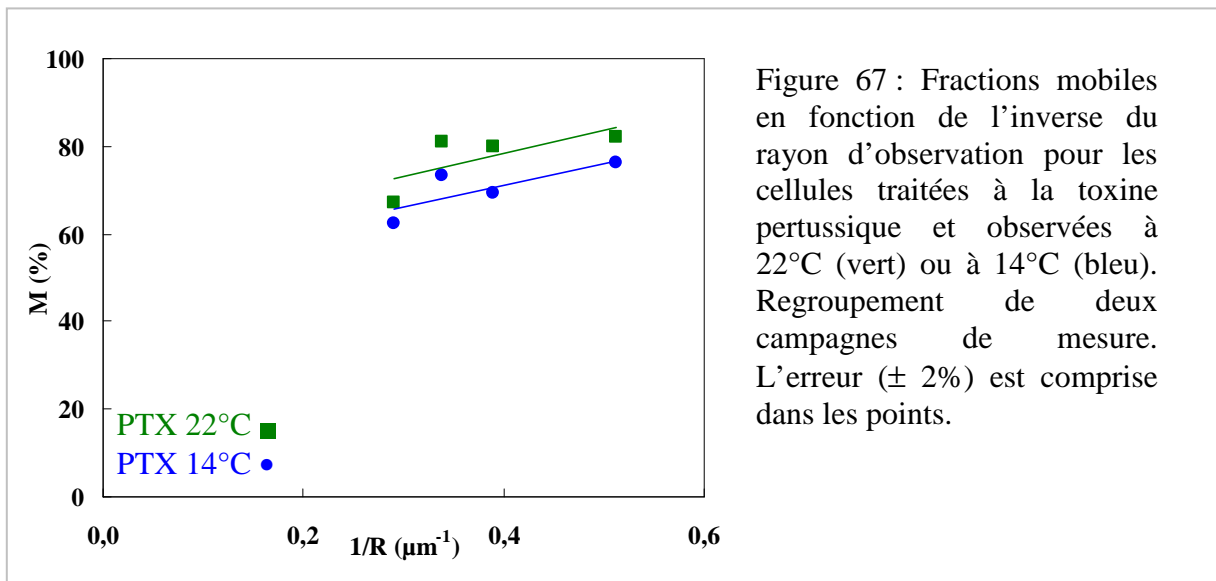
	PBS 22°C	PTX 22°C
Rayon des domaines (μm)	$1,2 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,4$
M_p (%)	52 ± 12	49 ± 13
$D_{\text{réel}}$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$

Tableau 15 : Paramètres obtenus en FRAPrv à partir du regroupement de 4 campagnes de mesure sur cellules traitées à la toxine pertussique (PTX), ou non (PBS), à 22°C.



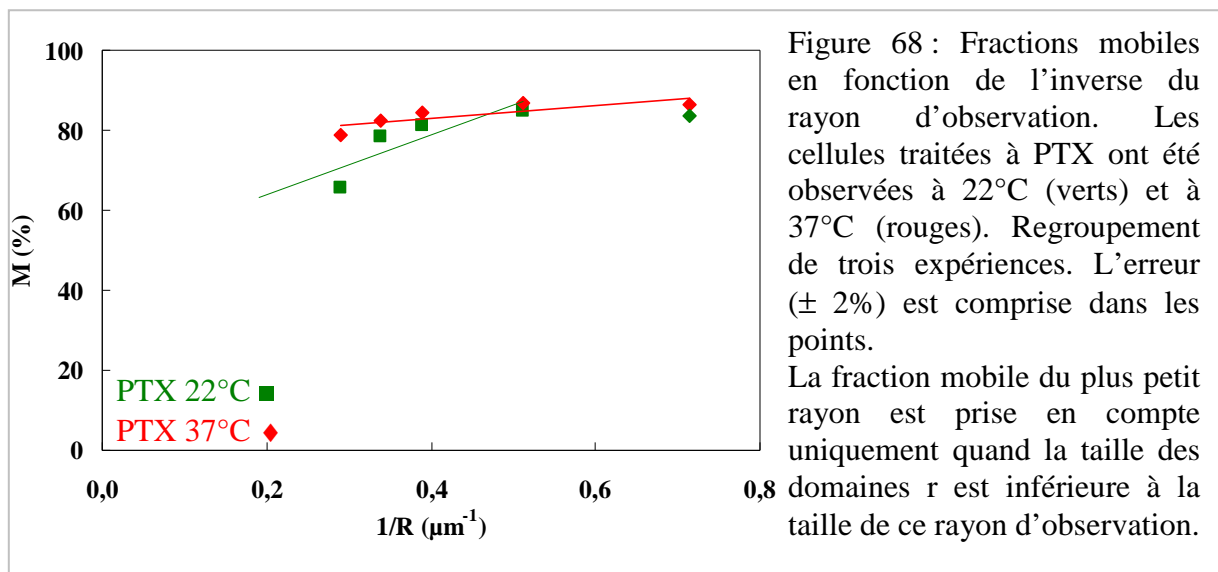
1.4.2 – Dynamique des récepteurs μ^* à 14°C

A 14°C l'organisation des récepteurs n'est pas beaucoup modifiée par rapport à 22°C : les domaines et les coefficients de diffusion restent identiques à ceux observés à température ambiante. On retrouve néanmoins une diminution des fractions mobiles de $7 \pm 2\%$ (fig. 67), c'est-à-dire une plus faible proportion de récepteurs diffusant à longue distance à 14°C qu'à 22°C. Cette diminution de M_p à 14°C avait déjà été observée sur cellules non traitées et sur cellules traitées à la cytochalasine D. Il semblerait donc que ce phénomène soit une conséquence de la diminution de la température, et non de la perturbation des protéines G.



1.4.3 – Dynamique des récepteurs μ^* à 37°C

La diffusion des récepteurs à température physiologique dans la membrane de cellules traitées à la toxine pertussique est en revanche modifiée de manière importante par rapport aux cellules témoins. En effet la fraction mobile devient quasi invariante en fonction de l'inverse du rayon d'observation. La droite passant par ces points indique une taille de domaines légèrement inférieure à 200 nm, ce qui est en deçà de la limite de résolution de notre technique (fig. 68). Le second critère permettant de vérifier l'existence des domaines est la variation du coefficient de diffusion expérimental en fonction du rayon d'observation. En présence de domaines, le coefficient de diffusion réel recalculé à partir de D_{exp} et de l'équation 12 (chapitre II) doit devenir invariant avec le rayon d'observation. Cette condition n'est pas respectée ici car la variation des D_{exp} mesurés est plus faible (en fonction du rayon d'observation) que celle des $D_{\text{réels}}$ recalculés. On peut donc conclure à une absence d'organisation en domaines des récepteurs μ^* lorsque les cellules sont pré-traitées à la toxine pertussique et observées à 37°C, c'est-à-dire lorsque les protéines G ne sont pas en capacité de se lier aux récepteurs.



Près de 80 % des récepteurs diffusent à longue distance, avec des coefficients de diffusion de $0,8 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (tableau 16). Les récepteurs μ^* sont donc beaucoup plus rapides qu'à 22°C, d'un facteur 10. De même cette différence d'un facteur 10 existe par rapport aux récepteurs des cellules non traitées observées à 37°C ($8 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$). Les 20 % restants sont immobiles, ou avec des coefficients de diffusion trop lents pour être résolus. Enfin le

traitement par la toxine pertussique n'a pas affecté la diffusion des sondes lipidiques insérées dans la membrane plasmique, et observé à température ambiante (fig. 69).

	<i>PBS 22°C</i>	<i>PTX 22°C</i>	<i>PTX 37°C</i>	<i>PBS 37°C</i>
Rayon des domaines (μm)	$1,2 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,2$
Mp (%)	50 ± 11	49 ± 13	77 ± 3	49 ± 5
$D_{\text{réel}}$ (μm ² /s)	$(8 \pm 4).10^{-2}$	$(8 \pm 7).10^{-2}$	$(8 \pm 1).10^{-1}$	$(8 \pm 4).10^{-2}$

Tableau 16 : Paramètres obtenus en FRAPrv à partir du regroupement de trois expériences sur cellules traitées à la toxine pertussique observées à 22°C et 37°C. Les valeurs obtenues pour les témoins à 22 et 37°C (fig. 58) sont également indiquées.

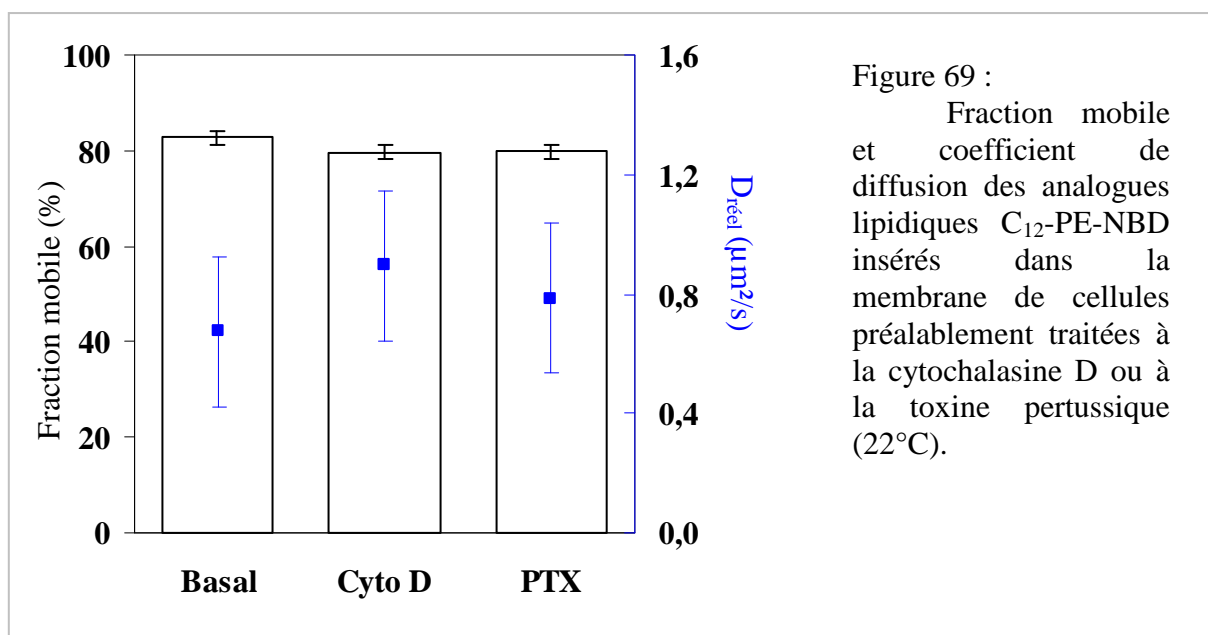


Figure 69 : Fraction mobile et coefficient de diffusion des analogues lipidiques C₁₂-PE-NBD insérés dans la membrane de cellules préalablement traitées à la cytochalasine D ou à la toxine pertussique (22°C).

1.4.4 – Origine des domaines et modèle d'organisation.

Ces résultats mettent en évidence le rôle prépondérant des protéines G dans l'organisation du récepteur μ*. En effet, le découplage des protéines G des récepteurs modifie significativement le comportement diffusionnel de ces derniers. Au lieu de diffuser dans des domaines jointifs perméables, les récepteurs μ* diffusent, près de dix fois plus rapidement, à

longue distance. Néanmoins, cet effet n'est visible qu'à température physiologique et non à température ambiante.

Les tests pharmacologiques d'efficacité de la toxine pertussique ont révélé que les récepteurs μ^* activés par un agoniste ne sont plus capables d'inhiber l'AC après le traitement des cellules à la PTX durant toute la nuit, que ce soit à 22°C ou à 37°C (cf chapitre III, §2.2.2, et figure 38). Ceci confirme que les récepteurs activés par un agoniste ne transmettent plus le signal à l'AC par le biais des protéines G.

La différence d'organisation membranaire des récepteurs à 22°C et à 37°C ne semble donc pas liée à une différence d'efficacité de la toxine entre ces deux températures. Il est donc probable que la température affecte un autre constituant membranaire, ou proche de la membrane, qui agit ensuite sur la diffusion du récepteur. Il s'agirait alors d'un effet indirect de la température par le biais d'un intermédiaire. Ce pourrait être un environnement lipidique particulier modifié par la température, ou bien d'autres protéines cytoplasmiques ou membranaires.

Cette analyse de la diffusion des récepteurs a été effectuée lorsque ces derniers sont à l'état basal. Les effets du traitement à la PTX démontrent donc un pré-couplage des récepteurs avec les protéines G. Lorsque ces protéines ne sont plus en interaction avec le récepteur, ce dernier diffuse librement dans la membrane. Ces résultats sont en accord avec un travail sur le MOR murin qui montre un pré-couplage transitoire avec les protéines G (Lober, 2006). Néanmoins la manière fine dont les protéines G régulent la diffusion des récepteurs reste à déterminer.

On peut supposer que les protéines G pré-couplées forment une pseudo-extrémité interne importante pour les récepteurs, ce qui limiterait leur diffusion par interaction avec des constituants sous-membranaires, par exemple le cytosquelette. Néanmoins nous avons vu que la déstructuration du cytosquelette cortical ne modifie pas la diffusion des récepteurs dans les grands domaines. On pourrait supposer, puisque tous les filaments d'actine ne sont probablement pas tous dépolymérisés, que ces derniers suffisent à la compartimentation. Le réseau de microtubules, une autre partie du cytosquelette, pourrait également être une des causes de ces grands domaines. Les microtubules sont présents majoritairement dans le cytoplasme et pointent vers la membrane. Il a été montré qu'ils peuvent également pénétrer jusque dans le réseau cortical d'actine et atteindre le voisinage proche de la membrane (Huet, 2006a ; Krylyshkina, 2003). Ils pourraient donc perturber la diffusion des récepteurs par le

biais des protéines G pré-couplées. La modification de ces domaines en lien avec la température reste également en question.

Deux études principales sont à mener dans le prolongement de ces travaux. D'une part l'étude complémentaire en SPT de la diffusion des récepteurs dans les membranes de cellules traitées à la toxine pertussique. D'autre part il faudrait identifier le rôle potentiel des microtubules sur les grands domaines observés en FRAPrv.

2 – Analyse par FRAPrv de la dynamique de μ^* en présence de ligands

Afin de relier l'organisation complexe du récepteur μ^* avec sa fonction nous avons effectué l'étude de sa diffusion en présence de ligands. Cette analyse est essentielle pour mieux comprendre les relations entre la dynamique et la fonction du récepteur. Deux antagonistes, n'induisant pas de réponse cellulaire, et deux agonistes, aux cinétiques d'internalisation différentes (cf. chapitre III, §4), ont été testés. Seule la technique du FRAPrv a été utilisée pour ces études.

2.1 – Effet des antagonistes

Un antagoniste peptidique (CTAP) et un antagoniste alcaloïdique (DPN) ont été utilisés, à température ambiante, dans des conditions saturantes. L'effet du CTAP a également été observé à 37°C. Ni la température, ni la nature de l'antagoniste, ne modifient l'organisation du récepteur. Les tailles des domaines sont comparables en absence ou en présence d'antagonistes (tableau 17). De même le coefficient de diffusion et la fraction mobile permanente ne sont pas perturbés.

	Basal	CTAP
Rayon des domaines (μm)	$0,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$
Mp (%)	58 ± 7	64 ± 7
$D_{\text{réel}}$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	$(5 \pm 2) \cdot 10^{-2}$	$(3 \pm 2) \cdot 10^{-2}$

Tableau 17 : Paramètres obtenus pour les récepteurs μ^* incubés ou non avec l'antagoniste CTAP à 1 μM , 30 minutes à 37°C. Regroupement de trois campagnes de mesure

Les effets de la fixation des antagonistes sur la diffusion des RCPG présentés dans la littérature sont variables et seront discutés dans le chapitre V. Citons néanmoins les résultats obtenus précédemment dans l'équipe sur le même récepteur exprimé dans les NRK et dont la diffusion a été étudiée en SPT. Dans ce cas, des variations importantes d'organisation avaient été observées. Après fixation de l'antagoniste, les récepteurs suivent principalement une diffusion confinée avec un déplacement aléatoire à longue distance et colocalise peu avec les puits de clathrine. Leur origine reste indéterminée (Daumas, 2002a).

Il serait donc intéressant de poursuivre notre étude par l'analyse de la diffusion du récepteur μ^* dans les cellules de neuroblastomes en SPT, afin de retrouver, ou non, un tel comportement.

2.2 – Effet des agonistes

A l'inverse des antagonistes, les deux agonistes testés, autant celui peptidique (DAMGO) que celui alcaloïdique (Morphine) ont entraîné une modification notable de l'organisation membranaire du récepteur μ^* .

2.2.1 – La morphine

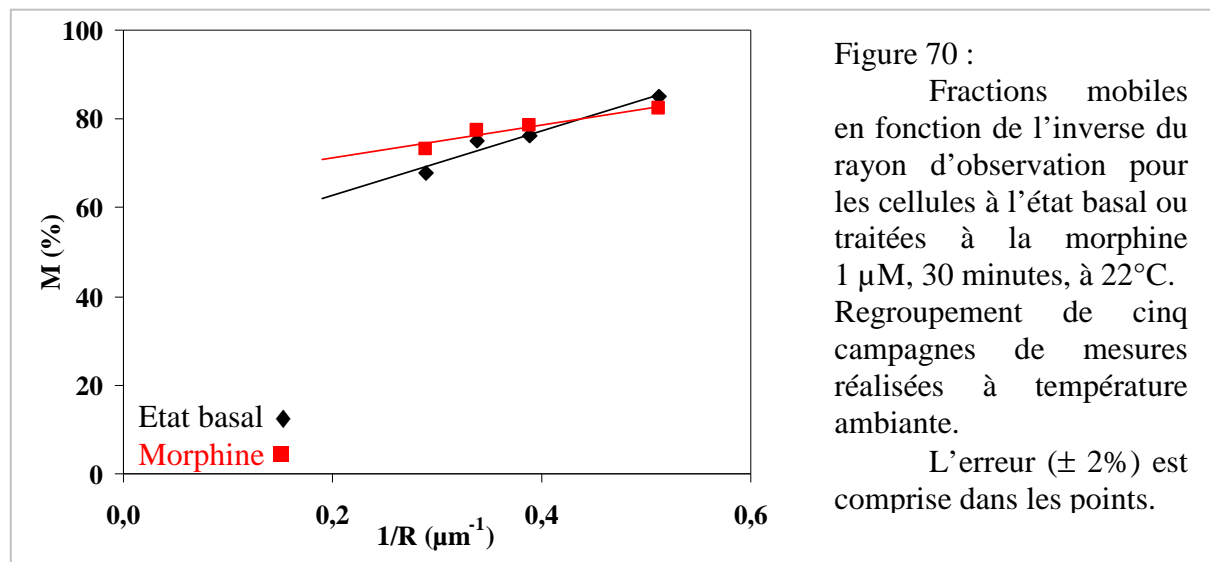
→ Effet de la morphine sur l'organisation de μ^*

Les cellules sont mises au contact de la morphine en concentration saturante (1 μ M) pendant 30 minutes à 22°C, puis la diffusion des récepteurs est étudiée à cette même température. Ces conditions évitent l'internalisation des récepteurs, et permettent leur maintien à la membrane (cf. chapitre III, §4).

Une modification importante de l'organisation du récepteur μ^* est causée par cet agoniste. Les résultats présentés ici correspondent au regroupement de plusieurs expériences indépendantes, chacune d'entre elles montre une modification de la diffusion des récepteurs, au niveau de la taille des domaines et des coefficients de diffusion. Cette modification est plus ou moins importante à chaque campagne de mesure, et le regroupement permet de rendre compte d'un effet global.

Dans un premier temps, on remarque que la fraction mobile varie en fonction du rayon d'observation (fig. 70), mais que la pente de la droite sur laquelle les points s'alignent est plus faible que pour l'état basal. Les tailles de domaines calculées à partir de ces pentes sont deux fois plus petites pour les récepteurs activés par la morphine que pour les récepteurs témoins, à

l'état basal. Cette diminution est corrélée à un ralentissement des récepteurs : de $7,5$ à $1,9 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (tableau 18). On peut remarquer que la taille des domaines est divisée par 2 alors que le coefficient de diffusion diminue d'un facteur 4, ce qui est compatible avec la relation $D \sim L^2$.



	Etat basal	Morphine
Rayon des domaines (μm)	$1,1 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$
M_p (%)	48 ± 5	64 ± 3
$D_{\text{réel}}$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	$(8 \pm 3) \cdot 10^{-2}$	$(2 \pm 1) \cdot 10^{-2}$

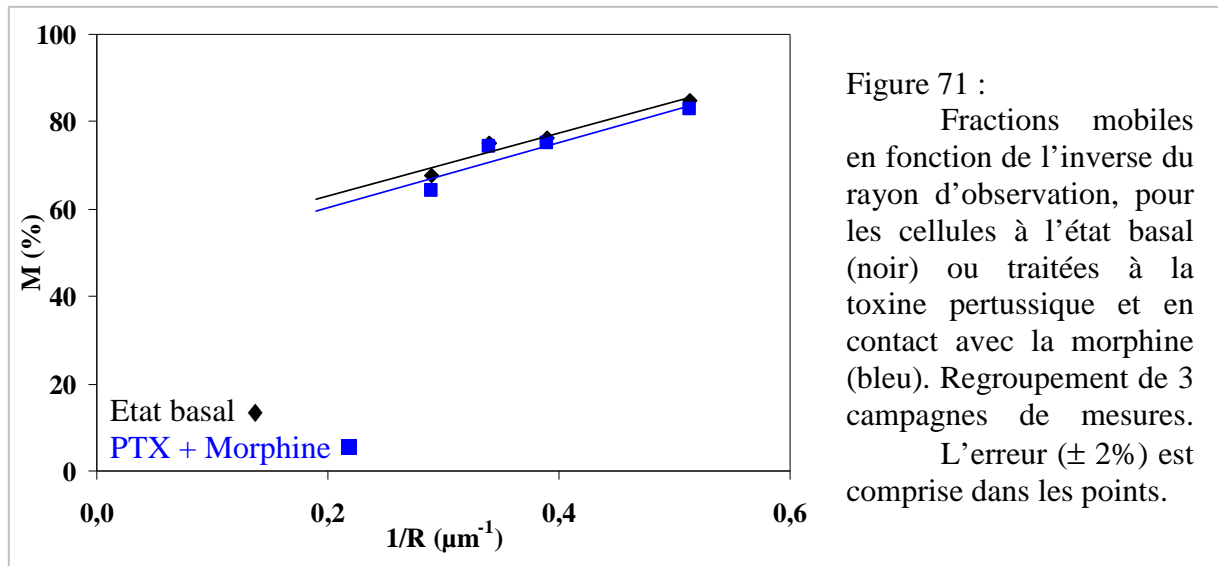
Tableau 18 : Paramètres obtenus en FRAPrv pour les récepteurs à l'état basal ou traités à la morphine, $1 \mu\text{M}$, 30 minutes, à 22°C (regroupement de cinq campagnes de mesures).

Au vu de la fraction mobile permanente élevée, il est possible que deux populations coexistent ou bien, comme à l'état basal, qu'il s'agisse d'un pourcentage de récepteurs capables de diffuser à longue distance. L'analyse selon le modèle à deux populations a donc été réalisée afin d'essayer d'affiner les résultats obtenus. Aucune amélioration significative de la somme des carrés des écarts entre l'ajustement et les données n'a été obtenue, l'analyse ne permet donc pas de distinguer deux populations. Cela laisse penser que nous sommes dans le même cas de figure qu'à l'état basal, c'est-à-dire des domaines jointifs perméables mais de plus petite taille.

→ Origine de ces domaines

Afin de comprendre la relation entre la dynamique observée et la fonction de transduction du signal réalisée par le récepteur après fixation de la morphine, l'origine de ces domaines a été recherchée. Les premières analyses ont été effectuées sur cellules traitées à la toxine pertussique c'est-à-dire ne possédant plus de protéines G capables de se lier aux récepteurs. Les cellules traitées, ou non, sont mises en contact avec la morphine et analysées à température ambiante.

L'effet du traitement apparaît clairement sur les fractions mobiles mais également sur les coefficients de diffusion. En effet les récepteurs des cellules traitées et soumises à la morphine ont une organisation latérale identique à ceux à l'état basal, sur cellules témoins. Les fractions mobiles restent identiques à celle des cellules à l'état basal (fig. 71) ce qui signifie une organisation en domaines de taille semblable (tableau 19). Les coefficients de diffusion ainsi que la fraction mobile permanente sont également comparables entre les cellules traitées à la toxine puis soumises à la morphine, et celles ne subissant aucun traitement. Pour rappel, la PTX seule ne modifie par l'organisation des domaines à cette température, ce qui nous permet de comparer directement les cellules traitées à la toxine pertussique et soumis à la morphine, avec des cellules à l'état basal.



22°C	PBS	PTX	Morphine	PTX + Morphine
Rayon des domaines (µm)	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4	0,6 ± 0,2	1,2 ± 0,3
Mp (%)	50 ± 11	49 ± 13	64 ± 3	46 ± 8
D _{réel} (µm ² /s)	(8 ± 4).10 ⁻²	(8 ± 7).10 ⁻²	(2 ± 1).10 ⁻²	(8 ± 4).10 ⁻²

Tableau 19 : Paramètres obtenus pour l'analyse en FRAPrv des récepteurs à l'état basal, ou en contact avec de la morphine en condition saturante, sur cellules pré-traitées à la toxine pertussique ou non. Regroupement de 3 campagnes de mesures. Les valeurs obtenues à l'état basal sur cellules pré-traitées ou non à la PTX (tableau 19) sont également indiquées.

La PTX n'empêche pas, a priori, la fixation des ligands sur le récepteur, mais agit sur l'interaction entre ce dernier et les protéines G. En l'absence de cette possibilité de liaison, la morphine n'induit plus de modification au niveau de la taille des domaines, ni des coefficients de diffusion. Ceci indique que les petits domaines dans lesquels les récepteurs diffusent plus lentement sont induits par les protéines G.

On peut comparer ce résultat avec l'observation de l'effet de la toxine pertussique sur l'organisation à l'état basal des récepteurs μ^* . Dans ce cas, il y a seulement un effet de cette toxine sur les domaines observés à 37°C, et non à 22°C. Les résultats obtenus ici avec la morphine indiquent que les effets de la toxine pertussique sont bien vus à température ambiante, les résultats obtenus pour l'état basal sont donc probablement la conséquence d'un double effet entre les protéines G et un autre constituant membranaire ou cytoplasmique.

→ **Modèle d'organisation des récepteurs μ^* activés par la morphine**

On ne peut pas distinguer deux populations au niveau des cellules traitées à la morphine alors que le nombre de retours de fluorescence regroupés est assez important (une centaine par rayon). Ceci indique que soit une des populations est très lente, donc inférieure à la limite de résolution du FRAPrv, soit les deux populations ont des proportions et des coefficients de diffusion proches, comme à l'état basal. Comme l'origine des grands domaines à l'état basal, et celle des domaines obtenus par activation des récepteurs à la morphine, ont les protéines G en commun, on peut supposer que ces domaines correspondent aux domaines de départ qui sont devenus plus petits. Par contre le coefficient de diffusion des récepteurs est diminué dans les domaines. Enfin la fraction mobile permanente est plus grande, ce qui indique que ces domaines sont plus perméables. Un modèle d'organisation des récepteurs après activation par la morphine est donc proposé figure 72, prenant en compte toutes les

informations obtenues par FRAPrv. Les analyses complémentaires n'ayant pu être effectuées en SPT, seuls les domaines déterminés en FRAPrv sont représentés.

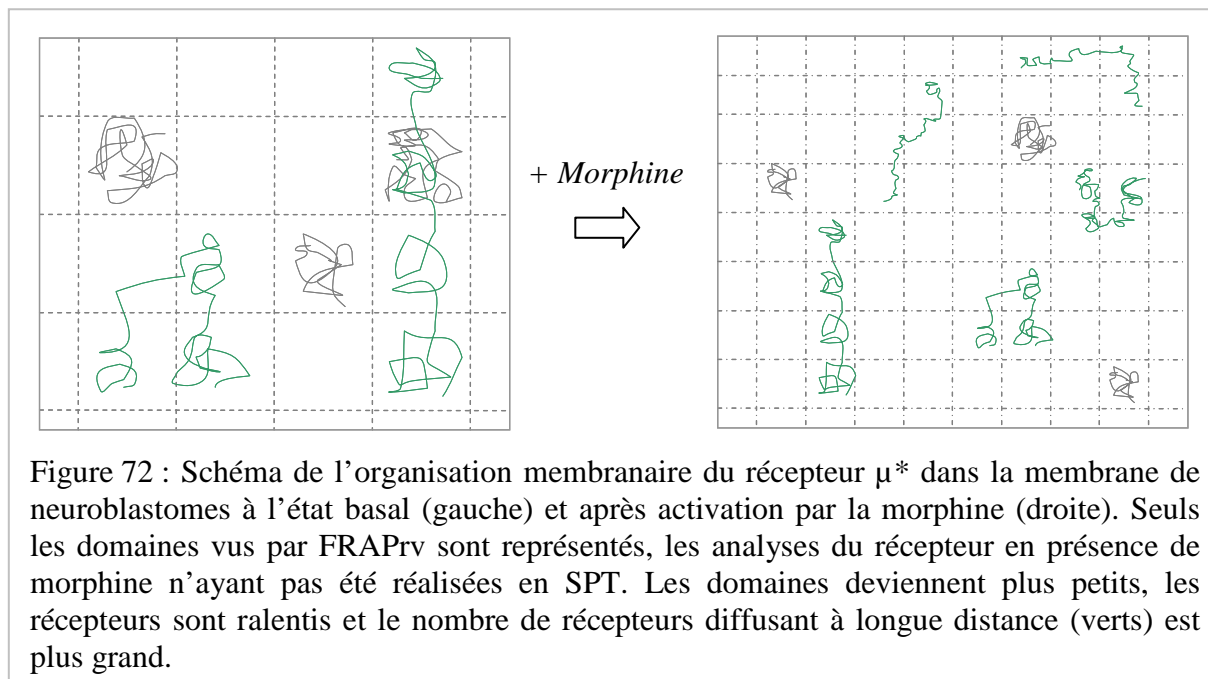


Figure 72 : Schéma de l'organisation membranaire du récepteur μ^* dans la membrane de neuroblastomes à l'état basal (gauche) et après activation par la morphine (droite). Seuls les domaines vus par FRAPrv sont représentés, les analyses du récepteur en présence de morphine n'ayant pas été réalisées en SPT. Les domaines deviennent plus petits, les récepteurs sont ralentis et le nombre de récepteurs diffusant à longue distance (verts) est plus grand.

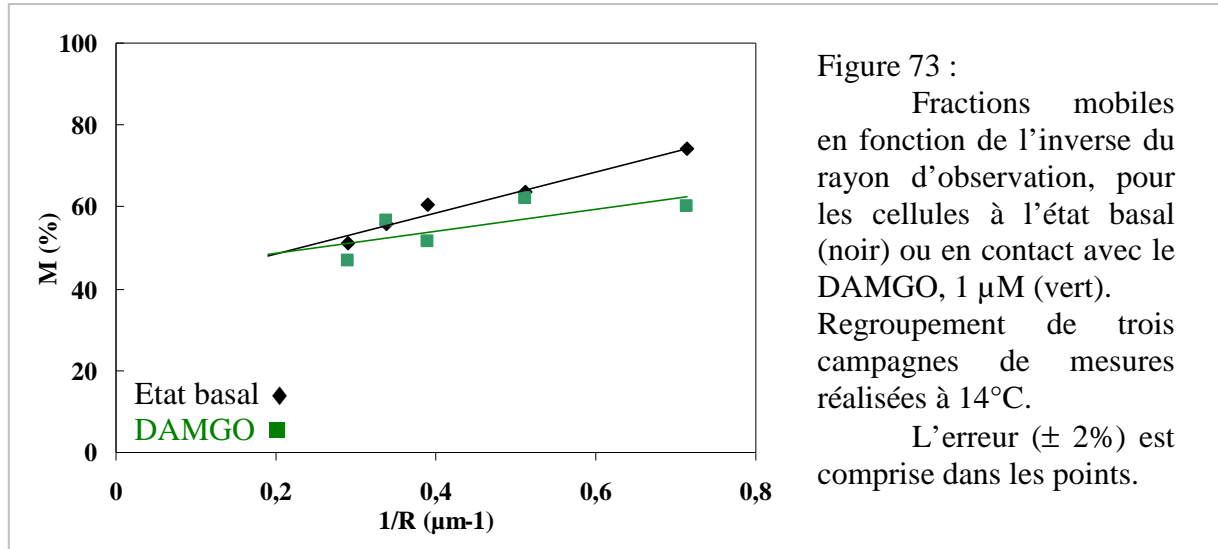
Il faut néanmoins noter que les résultats décrits dans la littérature et impliquant les protéines G dans la diffusion des récepteurs activés par un agoniste vont plutôt dans le sens d'une accélération des récepteurs probablement due au découplage des protéines G. C'est le cas notamment pour le récepteur à la sérotonine (Pucadyil, 2004) ou pour le récepteur mGluR5, qui voit sa diffusion augmentée d'un facteur 3 après activation, alors qu'il devient moins confiné (Sergé, 2002).

2.2.2 – Le DAMGO

→ Effet du DAMGO sur l'organisation de μ^*

L'effet d'un deuxième agoniste (le DAMGO) sur l'organisation dynamique du récepteur μ^* a été étudié. Sa fixation entraîne également la transduction du signal, et l'endocytose du récepteur. Cette internalisation est plus rapide (dès 15 minutes à 22°C) que celle induite par la morphine, ce qui nécessite de la bloquer pour faire l'étude en dynamique. Les cellules sont mises au contact du DAMGO en concentration saturante (1 μ M) pendant 10 minutes à 22°C, puis observées à 14°C, après 10 minutes de mise à température. La diminution de température permet d'éviter l'internalisation des récepteurs par des vésicules d'endocytose, comme cela avait été montré pour les récepteurs β -adrénergique (Cao, 1998).

Comme pour la morphine, une modification importante de l'organisation du récepteur μ^* est causée par le DAMGO. Cet agoniste entraîne une diminution de la taille des domaines systématique, mais variable. Dans certains cas cette diminution peut être de 80%. La figure 73 et le tableau 21 présentent les résultats du regroupement de trois campagnes de mesures indépendantes. La taille des domaines diminue de moitié (de 0,8 à 0,4 μm de rayon).



Une remarque est nécessaire pour l'interprétation de la variation des fractions mobiles en fonction du rayon d'observation sur les cellules traitées au DAMGO. Bien que les fractions mobiles aux rayons 1,95 μm et 1,4 μm aient environ la même valeur, la fraction mobile correspondant au plus petit rayon est prise en compte dans la pente. On ne peut pas considérer avoir atteint un plateau de la fraction mobile (cf. chapitre II, §1.3.2) car la taille de domaine mesurée sans ce dernier point est petite par rapport à la taille du dernier rayon d'observation. On est donc ici dans un régime de taille qui nécessite de prendre en compte ce rayon.

En plus de la diminution de taille de rayon, on observe un ralentissement des récepteurs (de 7 à $3 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$), et une fraction mobile permanente qui n'est pas modifiée par rapport à l'état basal (tableau 20). Cette fois la variation du coefficient de diffusion en fonction de la taille des domaines ne respecte pas strictement la relation $D \sim L^2$, ce qui indique peut être une différence quant à l'origine des domaines par rapport à ceux observés après l'ajout de morphine.

	Etat basal	DAMGO
Rayon des domaines (μm)	$0,8 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,4$
Mp (%)	39 ± 2	44 ± 7
$D_{\text{réel}}$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	$(7 \pm 2) \cdot 10^{-2}$	$(3 \pm 3) \cdot 10^{-2}$

Tableau 20 : Paramètres obtenus pour l'analyse en FRAPrv des récepteurs à l'état basal, ou en contact avec du DAMGO en condition saturante (1 μM). Regroupement de trois campagnes de mesures, à 14°C.

→ **Analyse à deux populations et modèle d'organisation**

Afin de déterminer un modèle d'organisation des récepteurs, un ajustement des données selon deux populations a été réalisé. L'amélioration de la somme des carrés des écarts, bien que faible (2 % en moyenne par rayon) est corrélée à l'apparition de deux coefficients de diffusion, dont l'un est stable en fonction du rayon d'observation et l'autre non. Ce deuxième D, après correction (équation 12bis), devient également invariant. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 21.

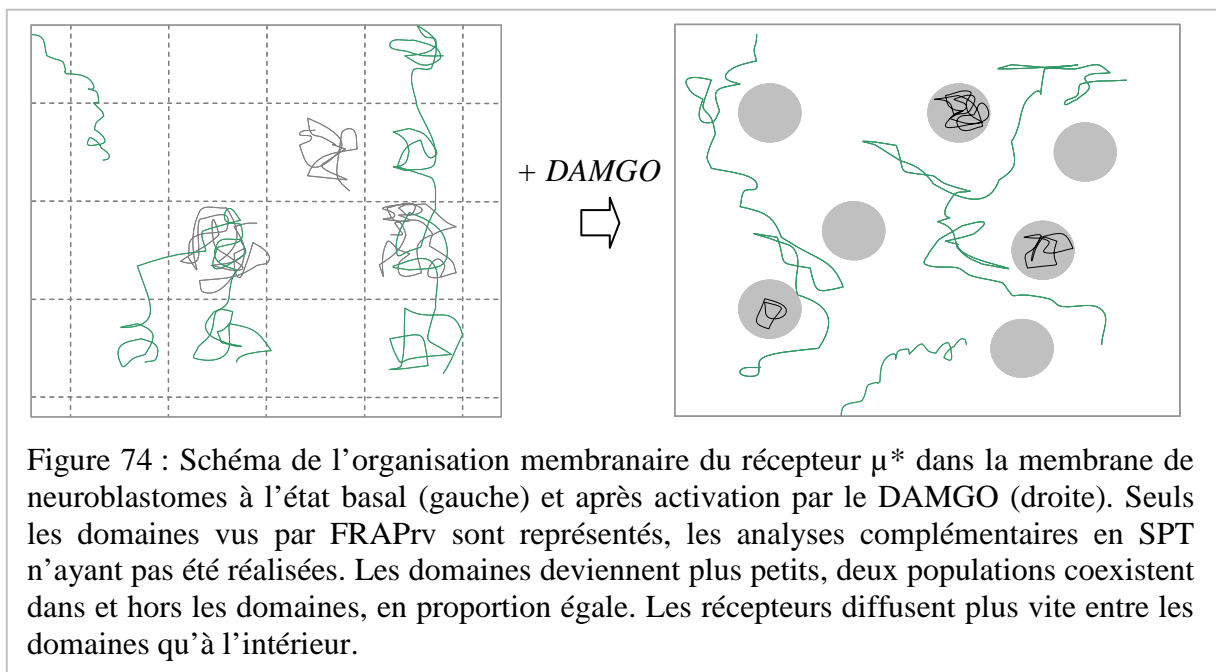
	Ajustement à une population	Ajustement à deux populations
Rayon des domaines (μm)	$0,4 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,4$
Mp (%)	44 ± 6	46 ± 11
$D_{\text{conf}} \text{ réel}$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	$(2,6 \pm 2,8) \cdot 10^{-2}$	$(4,9 \pm 5,8) \cdot 10^{-2}$
$D_{\text{libre}} \text{ réel}$ ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)		$(3,4 \pm 1,6) \cdot 10^{-1}$
Proportion (P) de récepteurs libres (%)	-	53 ± 12

Tableau 21 : Paramètres obtenus par ajustement à une ou à deux populations du regroupement des retours de fluorescence obtenus après mise en contact des récepteurs avec le DAMGO, et observation à 14°C.

Les tailles de domaines obtenues et les fractions mobiles permanentes sont identiques. Cette analyse révèle la présence de deux populations de poids égal (53 % à l'extérieur des domaines pour 47 % à l'intérieur, ± 12 %). Ces deux groupes ont des coefficients de diffusion différents d'un facteur 10 environ. Les récepteurs dont le coefficient de diffusion

expérimental ne nécessite pas de correction, c'est-à-dire est stable en fonction du rayon, correspond aux récepteurs à l'extérieur des domaines (D_{libre}). Ces derniers sont 10 fois plus rapides que ceux présents dans les domaines (D_{conf}). Ce résultat indique clairement une nouvelle organisation membranaire.

L'organisation en domaines jointifs perméables suppose que les récepteurs capables de diffuser à longue distance aient un coefficient de diffusion proche ou inférieur à celui des récepteurs dans les domaines. En effet tous les récepteurs sont dans un environnement identique, et seul le passage d'un domaine à l'autre peut en ralentir certains. Dans le cas des récepteurs activés par le DAMGO, les récepteurs diffusant à longue distance ont un coefficient de diffusion bien plus élevé que celui des récepteurs confinés. L'hypothèse des domaines jointifs perméables n'est donc plus cohérente avec ces résultats. Au contraire ces données indiquent l'existence de deux populations distinctes de récepteurs, l'une à l'intérieur de domaines disjoints, l'autre diffusant librement entre ces domaines. L'activation du récepteur par le DAMGO entraîne donc un réarrangement des récepteurs. On va ici privilégier le cas le plus simple, c'est-à-dire des domaines non jointifs fermés et une population qui diffuse librement entre les domaines (fig. 74). Néanmoins, il est possible que ces domaines puissent être ouverts ce qui entraînerait l'existence d'une troisième population de récepteurs.



→ **Origine de ces domaines**

Nous avons cherché à déterminer l'origine de ces *nouveaux* domaines. Les deux causes recherchées ont été une interaction avec les protéines G ou avec le cytosquelette. Ni le traitement par la toxine pertussique, qui empêche le couplage des protéines G avec les récepteurs, ni celui avec la cytochalasine D, qui déstabilise le cytosquelette d'actine, n'ont d'effet sur la réorganisation des récepteurs activés par le DAMGO. La taille des domaines dans lesquels diffusent les récepteurs en présence de DAMGO est comparable quel que soit le traitement qu'aient préalablement subi les cellules. De même aucune modification du coefficient de diffusion, ni de la fraction mobile permanente n'est observée.

Sur les cellules pré-traitées à la toxine pertussique les deux populations sont toujours distinguées, avec des poids et des coefficients de diffusion comparables. L'expérience sur les cellules dont le cytosquelette a été détruit n'a été réalisée qu'une fois, ce qui est insuffisant pour mener l'analyse à deux populations.

La réorganisation membranaire des récepteurs activés par le DAMGO reste encore indéterminée. Elle ne provient pas d'une interaction avec les protéines G, ni avec le cytosquelette. L'hypothèse la plus probable est celle d'une réorganisation liée à l'internalisation des récepteurs. En effet, la diminution de température permet d'empêcher l'entrée des vésicules dans le cytoplasme mais on peut supposer que le réarrangement dans la membrane a lieu encore plus précocement, et que la diminution de température ne le bloque pas puisque les récepteurs sont toujours capables de diffuser.

Cette hypothèse est souvent avancée dans le cas d'une organisation en plus petits domaines, accompagnée d'un ralentissement des récepteurs, après activation par un agoniste, ce qui est le cas du récepteur odorant OR17-40 (Jacquier, 2006). De plus elle a été démontrée par colocalisation avec la β -arrestine dans le cas des récepteurs NK2 (Cézanne, 2004). Enfin des résultats obtenus précédemment dans l'équipe sur le récepteur T7-hMOR exprimé dans les NRK montrent également une localisation majoritaire des récepteurs activés par le DAMGO dans des puits de clathrine. L'analyse en SPT a révélé que ces récepteurs n'avaient pas une diffusion de type confinée (Daumas F., non publié).

2.2.3 – Comparaison de l'effet des deux agonistes sur l'organisation membranaire de μ^*

Les deux agonistes testés entraînent une modification de l'organisation du récepteur μ^* dans la membrane. Ces modifications présentent des homologies, en particulier au niveau de la taille des domaines et des coefficients de diffusion, qui sont comparables. En revanche, il existe une différence importante au niveau de la fraction mobile permanente, puisqu'elle est plus faible dans le cas du DAMGO (44 %) que dans celui de la morphine (65 %). Même en tenant compte de la différence de température qui cause une diminution d'environ 6 % de M_p , la proportion de récepteurs diffusant à longue distance est plus faible lorsque les cellules sont traitées avec le DAMGO.

L'ajustement des données selon deux populations met en évidence deux organisations différentes des récepteurs traités avec les deux agonistes. En effet les récepteurs ayant fixé la morphine s'organisent en domaines jointifs perméables qui autorisent une diffusion à longue distance à travers eux ; alors que ceux ayant fixé le DAMGO s'organisent en domaines disjointifs avec une seconde population qui diffusent librement entre ces domaines.

Les domaines induits par les deux agonistes ont des origines différentes, bien qu'ils proviennent, au départ, de la même organisation des récepteurs. En effet le changement de la diffusion des récepteurs par l'ajout de morphine n'est plus possible quand les protéines G ne sont plus capables de se lier aux récepteurs. Ceci indique que la réorganisation des récepteurs activés par la morphine est due aux protéines G, et donc à la transduction du signal. En ce sens, les grands domaines dans lesquels diffusent les récepteurs à l'état basal seraient des précurseurs à ces domaines fonctionnels induits par le ligand. Au contraire la réorganisation des récepteurs ayant fixé le DAMGO n'est pas due à l'interaction avec des protéines G, ni au cytosquelette cortical, puisqu'aucun des traitements effectués ne permet d'empêcher leur formation. On peut alors supposer que ces domaines reflètent la redistribution des récepteurs vers les puits de clathrine en vue de l'internalisation.

Les deux agonistes testés entraînent une signalisation du récepteur μ^* vers l'adenylyl cyclase, mais le DAMGO cause en plus une internalisation massive et rapide. Les résultats obtenus ont donc permis de mettre en évidence les effets différents de ces deux agonistes sur l'organisation du récepteur. On peut distinguer la réorganisation liée à la transduction du

signal par les protéines G (morphine) de la réorganisation due à l'internalisation des récepteurs (DAMGO).

La différence de cinétique d'internalisation entre les deux agonistes est probablement à l'origine des comportements diffusionnels distincts. Afin de le vérifier, il faudrait analyser la diffusion des récepteurs après une incubation avec la morphine dans des conditions capables d'entraîner l'internalisation (37°C). On devrait alors observer une réorganisation des récepteurs semblables à celle induite par le DAMGO. De plus il serait intéressant de tester une autre méthode pour bloquer l'endocytose induite par le DAMGO plus en amont, par exemple en utilisant un milieu riche en saccharose qui empêche la réorganisation des molécules de clathrine (Heuser, 1989 ; Jacquier, 2006).

Chapitre V

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'analyse du comportement diffusif du récepteur μ^* opioïdes humains dans la membrane de neuroblastomes par deux techniques complémentaires a révélé une organisation complexe de ce récepteur couplé aux protéines G, générée par des origines diverses. Les récepteurs sont doublement compartimentés dans la membrane. D'une part, dans des domaines de grande taille observés en FRAPrv de près de 1 μm de rayon, perméables, c'est-à-dire permettant la diffusion à longue distance des récepteurs. D'autre part, dans des domaines de plus petite taille, observés en SPT, de moins de 250 nm de rayon. Enfin une forte proportion des récepteurs suit un mode de diffusion dirigée.

→ Résultats et perspectives du point de vue des techniques

Un des intérêts de cette étude consiste à étudier le même système biologique par deux techniques permettant l'analyse de la dynamique des constituants membranaires : le retour de fluorescence après photoblanchiment à rayon variable (FRAPrv) et le suivi de particule unique (SPT). Le FRAPrv permet de suivre la diffusion d'un ensemble de molécules d'intérêt et donc d'acquérir une information moyennée. Le SPT permet d'accéder à des informations à l'échelle de la molécule unique et donc de distinguer différents types de diffusions suivis par les récepteurs. L'utilisation conjointe de ces deux approches a tout d'abord permis de se rendre compte d'un problème majeur, dans les expériences de SPT, lié à la présence d'un glycocalyx. De plus, les différences d'échelles (temporelles et spatiales) accessibles ont permis d'accéder à des informations complémentaires et de visualiser de manière globale l'organisation complexe de ces récepteurs. Ces résultats confortent donc l'intérêt de l'utilisation conjointe du FRAPrv et du SPT, tout en soulevant certaines questions.

Tout d'abord, la contribution des récepteurs présentant des diffusions dirigées sur le retour de fluorescence mesuré en FRAPrv ne peut être évaluée. Le coefficient de diffusion des molécules ayant ce type de trajectoire étant plus faible que la limite accessible par cette technique (environ $10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$), elles sont généralement considérées immobiles en FRAPrv. Néanmoins la proportion importante de récepteurs suivant cette diffusion en SPT (de 40 à 70 % environ) ne correspond pas à la faible fraction immobile mesurée en FRAPrv (20 % au maximum). Ces récepteurs participent donc au retour de fluorescence, probablement grâce à leur vitesse de diffusion. Il est donc nécessaire de déterminer quelles variations ils peuvent entraîner, en particulier au niveau du coefficient de diffusion mesuré. Une des perspectives à ce travail consiste donc à mieux prendre en compte l'influence des trajectoires dirigées sur les résultats du FRAPrv, lorsqu'elles constituent une population importante. Le moyen le plus

efficace serait de simuler des diffusions dirigées, couplées à de la diffusion vraie, et d'analyser les retours de fluorescence engendrés. Une étude dans ce sens est prévue en collaboration avec Nicolas Destainville du laboratoire de Physique Théorique de Toulouse.

De plus le suivi de particule unique peut induire un biais dans l'analyse de la diffusion. En effet, il est possible que le marquage des récepteurs par les colloïdes ne soit pas représentatif de l'ensemble des récepteurs. Par exemple, des récepteurs diffusant avec un coefficient de diffusion élevé participent au retour de fluorescence mais sont difficilement suivis en SPT. La fixation de la particule sur la molécule d'intérêt est la principale source de biais de cette technique, ce qui renforce le choix d'utiliser le FRAPrv en parallèle. En effet ce dernier a l'avantage d'utiliser un marquage différent qui prend en compte tous les récepteurs, et d'obtenir des valeurs moyennes.

Afin d'affiner les résultats obtenus par les deux techniques, l'utilisation de systèmes modèles compartimentés, ou même doublement compartimentés serait utile et nécessaire. Un tel travail est déjà entamé dans l'équipe en collaboration avec Christophe Vieu (LAAS, Toulouse) à partir de bicouches planes structurées (Kung, 2000). Des domaines lipidiques plans sont formés entre des barrières protéiques, la diffusion des lipides est permise dans les domaines délimités par ces barrières, mais non entre ces zones. Par la suite, les barrières protéiques pourront être plus ou moins ouvertes, et permettront ainsi l'analyse de la diffusion à longue distance en passant de domaine en domaine. Cette étude de systèmes modèles sera complétée par des simulations qui permettront de mieux appréhender la différence entre une organisation en domaines jointifs perméables et une organisation en domaines non jointifs fermés (ou non) couplée à une diffusion à longue distance entre ces domaines.

Enfin des améliorations peuvent également être apportées pour l'étude en SPT, en particulier au niveau de la fréquence d'acquisition du système. En effet, nous avons vu que le temps caractéristique de diffusion d'une molécule dans un domaine doit être supérieur à 2 fois la fréquence d'acquisition pour mesurer des paramètres avec moins de 10 % d'erreurs (Eq. 25, (Destainville, 2006)). Lors de ce travail, cette condition a imposé des limites lors de l'étude à l'état basal (cf. chapitre IV §1.1.3), mais surtout pour l'étude réalisée en présence de cytochalasine D (cf. chapitre IV §1.3.2). Une augmentation de la fréquence d'acquisition permettrait d'améliorer la résolution de notre système de SPT. Ceci pourra être réalisé soit en utilisant une caméra avec une fréquence d'acquisition plus rapide (Kusumi, 2005), soit en mettant en œuvre la technique de *laser particle tracking* (Helfer, 2000).

→ **Organisation membranaire du récepteur μ^* : résultats**

Nous avons pu décrire trois types principaux d'organisation membranaire des récepteurs T7-EGFP-hMOR : d'une part, une diffusion confinée dans des grands domaines, d'autre part dans des domaines de plus faible taille, enfin des récepteurs qui suivent une diffusion dirigée. L'analyse de la diffusion latérale, en FRAPrv, d'un analogue lipidique inséré dans la membrane n'est pas sensible à cette structuration de la membrane et diffuse librement. Nous avons ensuite cherché à comprendre l'origine de l'organisation particulière des récepteurs dans la membrane, en lien avec leur fonction.

Une structuration de la membrane plasmique en double compartimentation a déjà été observée précédemment. Ainsi le récepteur mu opioïde murin, dans la membrane de cellules NRK, a une diffusion restreinte dans des domaines de 200 et 700 nm de diamètre, générés par des filaments d'actine (Suzuki, 2005). Des analyses par FCS à waist variable ont également révélé que la compartimentation de certaines protéines était soumise à différentes causes. Ainsi la diffusion du récepteur à la transferrine est restreinte par le cytosquelette mais également par le taux de cholestérol présent dans la membrane. Dans ce cas également les glycerophospholipides testés diffusent librement dans la membrane (Lenne, 2006).

Nous avons pu mettre en évidence que les domaines de 1 μm de rayon mettent en jeu la liaison des protéines G avec les récepteurs. Le fait de bloquer l'interaction de ces partenaires essentiels avec les récepteurs empêche la transduction du signal et l'organisation en grands domaines. Cette déstructuration des domaines entraîne également une accélération des récepteurs, le coefficient de diffusion devenant dix fois plus rapide que celui des récepteurs témoins. Ces résultats révèlent un pré-couplage des protéines G avec les récepteurs : les protéines G sont impliquées dans la compartimentation des récepteurs, tout en le ralentissant. Nous avons vu que les protéines G hétéro-trimériques ont une taille comparable à celle du récepteur (cf. introduction, fig. 6). Leur pré-couplage peut donc limiter la diffusion du récepteur par des interactions avec d'autres constituants sous-membranaires. Nous avons vu que le cytosquelette d'actine ne participe pas à la formation de ces grands domaines. Un autre candidat serait peut-être les microtubules, en particulier les pointes qui peuvent être proches de la membrane (Huet, 2006a ; Krylyshkina, 2003), et de ce fait pourraient perturber la diffusion de l'ensemble récepteur-protéine G.

De plus la perturbation des domaines induite par le découplage des protéines G est spécifique de la température physiologique, laissant supposer l'implication dans leur

maintien, ou leur formation, d'autres constituants membranaires ou proches de la membrane sensibles à la modification de la température.

Le SPT a montré que certains récepteurs ont leur diffusion limitée à l'intérieur de petits domaines, de taille inférieure à 250 nm de rayon. À température ambiante, leurs coefficients de diffusion varient en fonction du carré de la taille des domaines. Une telle variation est la signature du modèle développé à partir de travaux précédents, qui postule que des interactions protéiques à longue distance peuvent être la cause de domaines (cf. chapitre I, §3.2.3 (Daumas, 2003a, b)). Les domaines de plus grandes tailles observés en SPT ne respectent plus cette relation, ce qui est cohérent avec un effet de « portée maximale » pour les interactions à longue distance d'un système multi-protéiques. Il semblerait que cette limite se situe vers 300 nm de rayon des domaines.

Les domaines observés en SPT sont sensibles à la température, en effet le nombre de récepteurs présentant une diffusion confinée diminue fortement à 37°C, au profit des diffusions dirigées. Il est possible que les interactions ne soient pas suffisantes pour maintenir les récepteurs en domaines lorsque l'agitation thermique augmente, ou lorsque d'autres interactions viennent moduler l'équilibre précédent. Néanmoins, les récepteurs restant confinés, le sont dans des domaines de tailles plus petites et ont des coefficients de diffusion plus faibles. En ce sens la variation du coefficient de diffusion en fonction de la taille des domaines est toujours cohérente avec le modèle. Les récepteurs présents dans ces petits domaines semblent également être influencés par le cytosquelette d'actine. En effet l'analyse plus approfondie de la diffusion à longue distance des récepteurs (Meilhac, 2006) présentant une diffusion confinée combinée à une diffusion aléatoire, a permis de détecter la présence de sauts entre les domaines. Ces sauts sont généralement considérés comme la signature du modèle de compartimentation par le cytosquelette cortical (Kusumi, 2005). Une autre hypothèse est le passage des récepteurs d'une zone d'interaction entre protéines à une autre. Enfin, le nombre de récepteurs présentant un confinement de taille inférieure à 250 nm diminue lorsque les filaments d'actine sont déstructurés. Il semble donc que les domaines de taille inférieure à 250 nm soient la conséquence de plusieurs causes : interaction à longue distance entre les protéines et influence du réseau sous-membranaire d'actine.

Enfin, le cytosquelette joue également un rôle dans la dynamique des récepteurs μ^* lorsqu'ils présentent une diffusion dirigée. En effet l'analyse en SPT après déstructuration du

cytosquelette a montré une diminution importante du nombre de récepteurs ayant une trajectoire dirigée. Ceci permet de supposer que les récepteurs impliqués interagissent, directement ou indirectement, avec les filaments d'actine. Le bienfondé de cette hypothèse est appuyé par le fait que l'extrémité C-terminale interne de hMOR interagit avec la filamine, une protéine permettant la liaison à ces filaments (Onoprishvili, 2003).

Cette étude a également mis en évidence le rôle important de la température dans l'organisation du récepteur T7-EGFP-hMOR dans la membrane des cellules. En effet nous avons vu que la déstabilisation des grands domaines par le découplage des protéines G n'est effectif qu'à température physiologique. De plus la proportion de récepteurs présentant les différents modes de diffusion en SPT varie selon la température utilisée pour l'observation. Enfin l'analyse en FRAPrv de la diffusion des récepteurs à 14°C entraîne une diminution de la fraction mobile permanente. Cette diminution est probablement due à un ralentissement global des constituants membranaires, tel que le montre la diminution du coefficient de diffusion des sondes lipidiques.

Enfin, la dynamique du récepteur μ^* a pu être reliée à sa fonction grâce à son analyse en présence de différents ligands. La liaison de l'antagoniste n'entraîne pas de modification de l'organisation latérale. Une étude précédente réalisée par SPT dans l'équipe, sur le même récepteur exprimé dans les NRK, avait montré au contraire une modification importante caractérisée par une réorganisation dans des domaines, sans lien avec les puits de clathrine (F. Daumas, non publié). Parmi les autres résultats publiés sur la dynamique de différents RCPG certains ne montrent aucune variation (Jacquier, 2006) alors que d'autres distinguent des changements importants (Pucadyil, 2004). La variabilité de ces résultats pourrait s'expliquer par les différences au niveau des RCPG étudiés, des types cellulaires ou même des conditions utilisées (température d'incubation, concentration, ...). L'activation du récepteur par des agonistes a permis de distinguer la réorganisation différente du récepteur suivant qu'il transmette le signal, ou qu'il soit engagé dans la voie du recyclage. Dans les deux cas un ralentissement des récepteurs est observé en même temps qu'une réorganisation dans des domaines de tailles plus petites.

Dans nos conditions d'observation, l'origine des domaines dans lesquels diffusent les récepteurs ayant fixé la morphine est l'interaction de ces récepteurs avec les protéines G. Ils conservent une diffusion à longue distance grâce à la probabilité de passage d'un domaine à

l'autre. La fixation de la morphine entraîne donc un réarrangement des récepteurs qui met en jeu les protéines G, en lien avec la transduction du signal. L'organisation observée induite par le DAMGO est différente puisque les récepteurs diffusent dans des petits domaines disjoints, et également entre ces domaines à longue distance. Les domaines induits par le DAMGO sont probablement liés aux étapes d'internalisation du récepteur, observés grâce à la cinétique très rapide induite par cet agoniste. De nombreux RCPG ont été décrits comme diffusant dans des petits domaines après fixation de l'agoniste, petits domaines considérés comme étant des puits de clathrine ou leurs précurseurs (Cézanne, 2004 ; Jacquier, 2006).

→ Organisation du récepteur μ^* : perspectives

Les perspectives en lien avec l'aspect technique de ce travail ont déjà été évoquées au début de ce chapitre. D'autres perspectives importantes existent pour compléter les résultats obtenus sur ce système biologique.

Tout d'abord il faudrait ajouter aux données obtenues en FRAPrv les données correspondantes en SPT dans les conditions non encore effectuées. L'effet du blocage de l'interaction des protéines G avec le récepteur, à 37°C, sera particulièrement intéressant à observer puisque cette condition déstabilise les grands domaines identifiés en FRAPrv. On peut notamment se demander comment les récepteurs ayant des diffusions dirigées, qui constituent la plus grande population à cette température, réagissent à une telle modification de leur environnement. La réorganisation des récepteurs due à la liaison des agonistes nécessite également d'être approfondie par une étude en suivi de particule unique. Afin de déterminer de manière plus précise la cause des domaines induits par le DAMGO, une autre méthode permettant de bloquer l'internalisation pourra être testée, telle que l'utilisation d'un milieu extérieur riche en saccharose (Heuser, 1989 ; Jacquier, 2006). De même, l'analyse de la diffusion des récepteurs après une mise en contact prolongée avec la morphine à 37°C, dans des conditions permettant d'induire l'internalisation, permettrait d'apporter des informations. En effet si les domaines induits par le DAMGO sont bien dus à l'endocytose des récepteurs, alors les récepteurs incubés avec la morphine dans des conditions induisant l'internalisation devraient avoir la même réorganisation membranaire.

Au niveau de l'influence du cytosquelette il sera intéressant de se pencher sur les effets d'autres drogues, capables soit de stabiliser le réseau d'actine, soit de déstabiliser le réseau de microtubules. Les microtubules semblent être une cible particulièrement intéressante, puisqu'ils ont déjà été montrés comme influençant la diffusion du récepteur

mGluR5, dans des modèles cellulaires neuronaux (Sergé, 2003). De plus une déstabilisation des microtubules permettra de se rendre compte si ces derniers influencent la formation des grands domaines observés en FRAPrv. Si ce n'est pas le cas il sera nécessaire de rechercher l'élément supplémentaire qui rentre en jeu dans leur formation. On peut penser à l'interaction avec des protéines d'échafaudage, mais seule la filamine est connue à l'heure actuelle.

Pour finir, une autre perspective intéressante de ce travail sera de différencier la lignée SH-SY5Y en neurones, et d'analyser les modifications de l'organisation membranaire du récepteur μ^* que cela entraîne. Il est connu que la différenciation de ces cellules module l'expression des protéines à la membrane, en plus des réarrangements morphologiques de la cellule (Linnala, 1997 ; Pahlman, 1995). Il y a notamment lors de cette étape une surexpression naturelle des récepteurs opioïdes (Yu, 1990 ; Zadina, 1994). Les récepteurs présentant des trajectoires dirigées ne semblent pas, dans notre étude, se diriger particulièrement dans une direction (se rapprocher ou s'éloigner du noyau). Il est possible que les cellules une fois différenciées, les récepteurs s'organisent avec des déplacements centrifuges ou centripètes comme cela a déjà pu être observé sur des neurones (Sergé, 2003).

En conclusion, ce travail a permis de mettre en lumière l'intérêt de l'utilisation conjointe de deux techniques, mais également l'organisation complexe de T7-EGFP-hMOR dans la membrane. Cette organisation dynamique est d'autant plus intéressante qu'elle est mise en relation avec la fonction de la protéine suivie. La mise en évidence d'une organisation des récepteurs influencée par des causes multiples est cohérente avec la vision qui se dégage actuellement d'une membrane en mosaïque.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdulla, F. A. and P. A. Smith.** 1997. Nociceptin inhibits T-type Ca²⁺ channel current in rat sensory neurons by a G-protein-independent mechanism. *J Neurosci* **17**: 8721-8.
- Abney, J. R., B. A. Scalettar and J. C. Owicki.** 1989. Mutual diffusion of interacting membrane proteins. *Biophys J* **56**: 315-26.
- Allen, R. D., J. Metzals, I. Tasaki, S. T. Brady and S. P. Gilbert.** 1982. Fast axonal transport in squid giant axon. *Science* **218**: 1127-9.
- Ammer, H. and R. Schulz.** 1994. Retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is associated with changes in the abundance of G proteins. *J Neurochem* **62**: 1310-8.
- Angers, S., A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairret, D. Chelsky, M. Dennis and M. Bouvier.** 2000. Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3684-9.
- Anson, M.** 1992. Temperature dependence and Arrhenius activation energy of F-actin velocity generated in vitro by skeletal myosin. *J Mol Biol* **224**: 1029-38.
- Axelrod, D., D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson and W. W. Webb.** 1976a. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* **16**: 1055-69.
- Axelrod, D., P. Ravdin, D. E. Koppel, J. Schlessinger, W. W. Webb, E. L. Elson and T. R. Podleski.** 1976b. Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 4594-8.

B

- Bagriacik, E. U. and K. S. Miller.** 1999. Cell surface sialic acid and the regulation of immune cell interactions: the neuraminidase effect reconsidered. *Glycobiology* **9**: 267-75.
- Bailey, C. P. and M. Connor.** 2005. Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr Opin Pharmacol* **5**: 60-8.
- Baker, A. M., A. Sauliere, G. Gaibelet, B. Lagane, S. Mazerès, M. Fourage, F. Bachelierie, L. Salomé, A. Lopez and F. Dumas.** 2007. CD4 interacts constitutively with multiple CCR5 at the plasma membrane of living cells: A vrFRAP approach. *J Biol Chem.*
- Baker, A., A. Saulière, F. Dumas, C. Millot, S. Mazères, A. Lopez and L. Salomé.** in press. Functional membrane diffusion of G-protein coupled receptors. *Eur. Biophys. J.*
- Bates, I. R., B. Hebert, Y. Luo, J. Liao, A. I. Bachir, D. L. Kolin, P. W. Wiseman and J. W. Hanrahan.** 2006. Membrane lateral diffusion and capture of CFTR within transient confinement zones. *Biophys J* **91**: 1046-58.
- Baumgart, T., S. T. Hess and W. W. Webb.** 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* **425**: 821-4.
- Bayer, M. E. and C. C. Remsen.** 1970. Structure of Escherichia coli after freeze-etching. *J Bacteriol* **101**: 304-13.
- Biedler, J. L., S. Roffler-Tarlov, M. Schachner and L. S. Freedman.** 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* **38**: 3751-7.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-7.

- Bockaert, J. and J. P. Pin.** 1998. [Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success]. *C R Acad Sci III* **321**: 529-51.
- Bockaert, J. and J. P. Pin.** 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* **18**: 1723-9.
- Borgdorff, A. J. and D. Choquet.** 2002. Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* **417**: 649-53.
- Bouvier, M.** 2001. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**: 274-86.
- Bouzigues, C. and M. Dahan.** 2007. Transient directed motions of GABA(A) receptors in growth cones detected by a speed correlation index. *Biophys J* **92**: 654-60.
- Brand, A. and E. Yavin.** 2001. Early ethanolamine phospholipid translocation marks stress-induced apoptotic cell death in oligodendroglial cells. *J Neurochem* **78**: 1208-18.
- Briddon, S. J., R. J. Middleton, Y. Cordeaux, F. M. Flavin, J. A. Weinstein, M. W. George, B. Kellam and S. J. Hill.** 2004. Quantitative analysis of the formation and diffusion of A1-adenosine receptor-antagonist complexes in single living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4673-8.
- Brillet, K., B. L. Kieffer and D. Massotte.** 2003. Enhanced spontaneous activity of the mu opioid receptor by cysteine mutations: characterization of a tool for inverse agonist screening. *BMC Pharmacol* **3**: 14.
- Brown, D.** 2002. Structure and function of membrane rafts. *Int J Med Microbiol* **291**: 433-7.
- Brown, D. A. and E. London.** 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol* **164**: 103-14.
- Burns, A. R., D. J. Frankel and T. Buranda.** 2005. Local mobility in lipid domains of supported bilayers characterized by atomic force microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* **89**: 1081-93.

C

- Cabrera-Vera, T. M., J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzoni and H. E. Hamm.** 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev* **24**: 765-81.
- Cao, T. T., R. W. Mays and M. von Zastrow.** 1998. Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits. *J Biol Chem* **273**: 24592-602.
- Capeyrou, R., J. Riond, M. Corbani, J. F. Lepage, B. Bertin and L. J. Emorine.** 1997. Agonist-induced signaling and trafficking of the mu-opioid receptor: role of serine and threonine residues in the third cytoplasmic loop and C-terminal domain. *FEBS Lett* **415**: 200-5.
- Carter, B. D. and F. Medzihradsky.** 1992. Opioid signal transduction in intact and fragmented SH-SY5Y neural cells. *J Neurochem* **58**: 1611-9.
- Carter, B. D. and F. Medzihradsky.** 1993. Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 4062-6.
- Cézanne, L., S. Lecat, B. Lagane, C. Millot, J. Y. Vollmer, H. Matthes, J. L. Galzi and A. Lopez.** 2004. Dynamic confinement of NK2 receptors in the plasma membrane. Improved FRAP analysis and biological relevance. *J Biol Chem* **279**: 45057-67.
- Chan, J. S., T. T. Chiu and Y. H. Wong.** 1995. Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. *J Neurochem* **65**: 2682-9.
- Chaturvedi, K., K. H. Christoffers, K. Singh and R. D. Howells.** 2000. Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers* **55**: 334-46.

- Chen, C., J. Li, G. Bot, I. Szabo, T. J. Rogers and L. Y. Liu-Chen.** 2004. Heterodimerization and cross-desensitization between the mu-opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor. *Eur J Pharmacol* **483**: 175-86.
- Chen, Y., B. C. Lagerholm, B. Yang and K. Jacobson.** 2006a. Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* **39**: 147-53.
- Chen, Y., W. R. Thelin, B. Yang, S. L. Milgram and K. Jacobson.** 2006b. Transient anchorage of cross-linked glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins depends on cholesterol, Src family kinases, caveolin, and phosphoinositides. *J Cell Biol* **175**: 169-78.
- Cheng, Y. and W. H. Prusoff.** 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: 3099-108.
- Chidiac, P.** 1998. Rethinking receptor-G protein-effector interactions. *Biochem Pharmacol* **55**: 549-56.
- Choquet, D. and A. Triller.** 2003. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* **4**: 251-65.
- Claing, A., S. A. Laporte, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz.** 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* **66**: 61-79.
- Cong, M., S. J. Perry, F. T. Lin, I. D. Fraser, L. A. Hu, W. Chen, J. A. Pitcher, J. D. Scott and R. J. Lefkowitz.** 2001. Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. *J Biol Chem* **276**: 15192-9.
- Connor, M. and M. D. Christie.** 1999. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**: 493-9.
- Connor, M., A. Yeo and G. Henderson.** 1996. The effect of nociceptin on Ca²⁺ channel current and intracellular Ca²⁺ in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol* **118**: 205-7.
- Cooper, J. A.** 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**: 1473-8.
- Courchaine, A. J., W. H. Miller and D. B. Stein, Jr.** 1959. Rapid semi-micro procedure for estimating free and total cholesterol. *Clin Chem* **5**: 609-14.
- Cvejjic, S. and L. A. Devi.** 1997. Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* **272**: 26959-64.
- Cvejjic, S., N. Trapaidze, C. Cyr and L. A. Devi.** 1996. Thr353, located within the COOH-terminal tail of the delta opiate receptor, is involved in receptor down-regulation. *J Biol Chem* **271**: 4073-6.

D

- Dahan, M., S. Levi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau and A. Triller.** 2003. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* **302**: 442-5.
- Dang, V. C. and J. T. Williams.** 2005. Morphine-Induced mu-opioid receptor desensitization. *Mol Pharmacol* **68**: 1127-32.
- Daumas, F.** 2002a. Diffusion latérale du récepteur μ aux opioïdes analysée par suivi de particule unique à la surface de cellules vivantes : relation organisation dynamique-fonction. *Biophysique*. Toulouse: Université Paul Sabatier. 147
- Daumas, F., N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean and L. Salome.** 2003a. Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophys J* **84**: 356-66.

- Daumas, F., N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean and L. Salome.** 2003b. Interprotein interactions are responsible for the confined diffusion of a G-protein-coupled receptor at the cell surface. *Biochem Soc Trans* **31**: 1001-5.
- Daumas, F., H. Mazarguil, C. Millot, A. Lopez and L. Salome.** 2002b. Probing functionalized gold colloids for single particle tracking experiments. *Biochem Biophys Res Commun* **295**: 610-5.
- De Brabander, M., H. Geerts, R. Nuydens and R. Nuyens.** 1989. Detection of gold probes with video-enhanced contrast microscopy: nanovid microscopy. *Am J Anat* **185**: 282-95.
- De Brabander, M., R. Nuydens, G. Geuens, M. Moeremans and J. De Mey.** 1986. The use of submicroscopic gold particles combined with video contrast enhancement as a simple molecular probe for the living cell. *Cell Motil Cytoskeleton* **6**: 105-13.
- De Brabander, M., R. Nuydens, A. Ishihara, B. Holifield, K. Jacobson and H. Geerts.** 1991. Lateral diffusion and retrograde movements of individual cell surface components on single motile cells observed with Nanovid microscopy. *J Cell Biol* **112**: 111-24.
- De Lean, A., J. M. Stadel and R. J. Lefkowitz.** 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **255**: 7108-17.
- Derzko, Z. and K. Jacobson.** 1980. Comparative lateral diffusion of fluorescent lipid analogues in phospholipid multibilayers. *Biochemistry* **19**: 6050-7.
- Destainville, N. and L. Salome.** 2006. Quantification and correction of systematic errors due to detector time-averaging in single-molecule tracking experiments. *Biophys J* **90**: L17-9.
- Dietrich, C., B. Yang, T. Fujiwara, A. Kusumi and K. Jacobson.** 2002. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys J* **82**: 274-84.
- Dietrich, G., G. Gaibelet, R. Capeyrou, J. L. Butour, F. Pontet and L. J. Emorine.** 1998. Implication of the first and third extracellular loops of the mu-opioid receptor in the formation of the ligand binding site: a study using chimeric mu-opioid/angiotensin receptors. *J Neurochem* **70**: 2106-11.
- Dunphy, J. T. and M. E. Linder.** 1998. Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta* **1436**: 245-61.
- Dupou, L.** 1987a. Contribution à l'étude de la dynamique et de la distribution latérale des lipides dans les membranes plasmiques de cellules eucaryotes. *Biophysique*. Toulouse: Université Paul Sabatier. 197
- Dupou, L., L. Gualandris, A. Lopez, A. M. Duprat and J. F. Tocanne.** 1987b. Alterations in lateral lipid mobility in the plasma membrane of urodelean ectodermal cells during gastrulation. *Exp Cell Res* **169**: 502-13.
- Dupou, L., A. Lopez and J. F. Tocanne.** 1988. Comparative study of the lateral motion of extrinsic probes and anthracene-labelled constitutive phospholipids in the plasma membrane of Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* **171**: 669-74.

E

- Edidin, M.** 2003. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**: 257-83.
- Edidin, M.** 2001. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol* **11**: 492-6.

- Edidin, M., M. C. Zuniga and M. P. Sheetz.** 1994. Truncation mutants define and locate cytoplasmic barriers to lateral mobility of membrane glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3378-82.
- Engelman, D. M.** 2005. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**: 578-80.

F

- Falk, J., O. Thoumine, C. Dequidt, D. Choquet and C. Faivre-Sarrailh.** 2004. NrCAM coupling to the cytoskeleton depends on multiple protein domains and partitioning into lipid rafts. *Mol Biol Cell* **15**: 4695-709.
- Farrens, D. L., C. Altenbach, K. Yang, W. L. Hubbell and H. G. Khorana.** 1996. Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**: 768-70.
- Ferguson, S. S.** 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* **53**: 1-24.
- Flanagan, M. D. and S. Lin.** 1980. Cytochalasins block actin filament elongation by binding to high affinity sites associated with F-actin. *J Biol Chem* **255**: 835-8.
- Frances, B., A. Puget, C. Moisand and J. C. Meunier.** 1990. Apparent precoupling of kappa- but not mu-opioid receptors with a G protein in the absence of agonist. *Eur J Pharmacol* **189**: 1-9.
- Fritsch, P., K. Wolff and H. Honigsmann.** 1975. Glycocalyx of epidermal cells in vitro: demonstration and enzymatic removal. *J Invest Dermatol* **64**: 30-7.
- Frye, L. D. and M. Edidin.** 1970. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J Cell Sci* **7**: 319-35.
- Fujiwara, T., K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson and A. Kusumi.** 2002. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* **157**: 1071-81.

G

- Gaibelet, G., R. Capeyrou, G. Dietrich and L. J. Emorine.** 1997. Identification in the mu-opioid receptor of cysteine residues responsible for inactivation of ligand binding by thiol alkylating and reducing agents. *FEBS Lett* **408**: 135-40.
- Gaibelet, G., E. Meilhoc, J. Riond, I. Saves, T. Exner, L. Liaubet, B. Nurnberg, J. M. Masson and L. J. Emorine.** 1999. Nonselective coupling of the human mu-opioid receptor to multiple inhibitory G-protein isoforms. *Eur J Biochem* **261**: 517-23.
- Gales, C., R. V. Rebois, M. Hogue, P. Trieu, A. Breit, T. E. Hebert and M. Bouvier.** 2005. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* **2**: 177-84.
- Gales, C., J. J. Van Durm, S. Schaak, S. Pontier, Y. Percherancier, M. Audet, H. Paris and M. Bouvier.** 2006. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 778-86.
- George, S. R., T. Fan, Z. Xie, R. Tse, V. Tam, G. Varghese and B. F. O'Dowd.** 2000. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* **275**: 26128-35.
- Georgiou, G., S. S. Bahra, A. R. Mackie, C. A. Wolfe, P. O'Shea, S. Ladha, N. Fernandez and R. J. Cherry.** 2002. Measurement of the lateral diffusion of human MHC class I molecules on HeLa cells by fluorescence recovery after photobleaching using a phycoerythrin probe. *Biophys J* **82**: 1828-34.

- Gether, U., S. Lin, P. Ghanouni, J. A. Ballesteros, H. Weinstein and B. K. Kobilka.** 1997. Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J* **16**: 6737-47.
- Gilman, A. G.** 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**: 615-49.
- Goddette, D. W. and C. Frieden.** 1986. Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J Biol Chem* **261**: 15974-80.
- Gomes, I., B. A. Jordan, A. Gupta, N. Trapaidze, V. Nagy and L. A. Devi.** 2000. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* **20**: RC110.
- Goodman, S. L., G. M. Hodges and D. C. Livingston.** 1980. A review of the colloidal gold marker system. *Scan Electron Microsc*: 133-46.
- Gouldson, P. R., C. Higgs, R. E. Smith, M. K. Dean, G. V. Gkoutos and C. A. Reynolds.** 2000. Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology* **23**: S60-77.
- Gudermann, T., F. Kalkbrenner and G. Schultz.** 1996. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 429-59.

#

- Hall, R. A., R. T. Premont and R. J. Lefkowitz.** 1999. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol* **145**: 927-32.
- Hasbi, A., J. Polastron, S. Allouche, L. Stanasila, D. Massotte and P. Jauzac.** 1998. Desensitization of the delta-opioid receptor correlates with its phosphorylation in SK-N-BE cells: involvement of a G protein-coupled receptor kinase. *J Neurochem* **70**: 2129-38.
- Hegener, O., L. Prenner, F. Runkel, S. L. Baader, J. Kappler and H. Haberlein.** 2004. Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry* **43**: 6190-9.
- Hein, P., M. Frank, C. Hoffmann, M. J. Lohse and M. Bunemann.** 2005. Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *Embo J* **24**: 4106-14.
- Helfer, E., S. Harlepp, L. Bourdieu, J. Robert, F. C. MacKintosh and D. Chatenay.** 2000. Microrheology of biopolymer-membrane complexes. *Phys Rev Lett* **85**: 457-60.
- Henderson, G. and A. T. McKnight.** 1997. The orphan opioid receptor and its endogenous ligand--nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 293-300.
- Heuser, J. E. and R. G. Anderson.** 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* **108**: 389-400.
- Horner, K. A. and J. E. Zadina.** 2004. Internalization and down-regulation of mu opioid receptors by endomorphins and morphine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res* **1028**: 121-32.
- Horvat, R. D., S. Nelson, C. M. Clay, B. G. Barisas and D. A. Roess.** 1999. Intrinsically fluorescent luteinizing hormone receptor demonstrates hormone-driven aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* **255**: 382-5.
- Huet, S.** 2006a. Analyse des mouvements des granules de sécrétion à proximité de la membrane plasmique par microscopie de fluorescence à excitation par onde évanescente. Paris: Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)
- Huet, S., E. Karatekin, V. S. Tran, I. Fanget, S. Cribier and J. P. Henry.** 2006b. Analysis of transient behavior in complex trajectories: application to secretory vesicle dynamics. *Biophys J* **91**: 3542-59.

Hur, E. M. and K. T. Kim. 2002. G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* **14**: 397-405.

/

Iiri, T., P. S. Backlund, Jr., T. L. Jones, P. B. Wedegaertner and H. R. Bourne. 1996. Reciprocal regulation of Gs alpha by palmitate and the beta gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14592-7.

Ikonen, E. 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 470-7.

J

Jacobson, K. and C. Dietrich. 1999. Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol* **9**: 87-91.

Jacobson, K., E. D. Sheets and R. Simson. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* **268**: 1441-2.

Jacquier, V., M. Prummer, J. M. Segura, H. Pick and H. Vogel. 2006. Visualizing odorant receptor trafficking in living cells down to the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14325-30.

Janecka, A., J. Fichna and T. Janeki. 2004. Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem* **4**: 1-17.

Jans, D. A., R. Peters and F. Fahrenholz. 1990. Lateral mobility of the phospholipase C-activating vasopressin V1-type receptor in A7r5 smooth muscle cells: a comparison with the adenylate cyclase-coupled V2-receptor. *Embo J* **9**: 2693-9.

Jans, D. A., R. Peters, J. Zsigo and F. Fahrenholz. 1989. The adenylate cyclase-coupled vasopressin V2-receptor is highly laterally mobile in membranes of LLC-PK1 renal epithelial cells at physiological temperature. *Embo J* **8**: 2481-8.

Jordan, B. A. and L. A. Devi. 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399**: 697-700.

K

Kazmi, S. M. and R. K. Mishra. 1986. Opioid receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: evidence for distinct morphine (mu) and enkephalin (delta) binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* **137**: 813-20.

Kazmi, S. M. and R. K. Mishra. 1987. Comparative pharmacological properties and functional coupling of mu and delta opioid receptor sites in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol* **32**: 109-18.

Keith, D. E., S. R. Murray, P. A. Zaki, P. C. Chu, D. V. Lissin, L. Kang, C. J. Evans and M. von Zastrow. 1996. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem* **271**: 19021-4.

Kenakin, T. 2002. Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 103-10.

Kirchhausen, T. 2000. Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 187-98.

Klinz, F. J., V. C. Yu, W. Sadee and T. Costa. 1987. Differential expression of alpha-subunits of G-proteins in human neuroblastoma-derived cell clones. *FEBS Lett* **224**: 43-8.

- Koch, W. J., J. Inglese, W. C. Stone and R. J. Lefkowitz.** 1993. The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **268**: 8256-60.
- Koppel, D. E., D. Axelrod, J. Schlessinger, E. L. Elson and W. W. Webb.** 1976. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophys J* **16**: 1315-29.
- Krueger, K. M. and J. T. Barbieri.** 1995. The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin Microbiol Rev* **8**: 34-47.
- Krylyshkina, O., K. I. Anderson, I. Kaverina, I. Upmann, D. J. Manstein, J. V. Small and D. K. Toomre.** 2003. Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *J Cell Biol* **161**: 853-9.
- Kung, L. A., L. Kam, J. S. Hovis and S. G. Boxer.** 2000. Patterning hybrid surfaces of proteins and supported lipid bilayers. *Langmuir* **16**: 6773-6776.
- Kurose, H., T. Katada, T. Amano and M. Ui.** 1983. Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic, and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J Biol Chem* **258**: 4870-5.
- Kusumi, A., C. Nakada, K. Ritchie, K. Murase, K. Suzuki, H. Murakoshi, R. S. Kasai, J. Kondo and T. Fujiwara.** 2005. Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **34**: 351-78.
- Kusumi, A. and Y. Sako.** 1996. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 566-74.
- Kusumi, A., Y. Sako and M. Yamamoto.** 1993. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* **65**: 2021-40.
- Kwik, J., S. Boyle, D. Fooksman, L. Margolis, M. P. Sheetz and M. Edidin.** 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13964-9.
- /
- Lagerholm, B. C., G. E. Weinreb, K. Jacobson and N. L. Thompson.** 2005. Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu Rev Phys Chem* **56**: 309-36.
- Law, P. Y., L. J. Erickson, R. El-Kouhen, L. Dicker, J. Solberg, W. Wang, E. Miller, A. L. Burd and H. H. Loh.** 2000. Receptor density and recycling affect the rate of agonist-induced desensitization of mu-opioid receptor. *Mol Pharmacol* **58**: 388-98.
- Law, P. Y., L. J. Erickson-Herbrandson, Q. Q. Zha, J. Solberg, J. Chu, A. Sarre and H. H. Loh.** 2005. Heterodimerization of mu- and delta-opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions. *J Biol Chem* **280**: 11152-64.
- Law, P. Y. and H. H. Loh.** 1999a. Regulation of opioid receptor activities. *J Pharmacol Exp Ther* **289**: 607-24.
- Law, P. Y., Y. H. Wong and H. H. Loh.** 1999b. Mutational analysis of the structure and function of opioid receptors. *Biopolymers* **51**: 440-55.
- Le Grimmelc, C., E. Lesniewska, C. Cachia, J. P. Schreiber, F. de Fornel and J. P. Goudonnet.** 1994. Imaging of the membrane surface of MDCK cells by atomic force microscopy. *Biophys J* **67**: 36-41.
- Lee, G. M., A. Ishihara and K. A. Jacobson.** 1991. Direct observation of brownian motion of lipids in a membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6274-8.

- Lee, G. M., F. Zhang, A. Ishihara, C. L. McNeil and K. A. Jacobson.** 1993. Unconfined lateral diffusion and an estimate of pericellular matrix viscosity revealed by measuring the mobility of gold-tagged lipids. *J Cell Biol* **120**: 25-35.
- Lenne, P. F., L. Wawrezinieck, F. Conchonaud, O. Wurtz, A. Boned, X. J. Guo, H. Rigneault, H. T. He and D. Marguet.** 2006. Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *Embo J* **25**: 3245-56.
- Leventhal, P. S., E. A. Shelden, B. Kim and E. L. Feldman.** 1997. Tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase during insulin-like growth factor-I-stimulated lamellipodial advance. *J Biol Chem* **272**: 5214-8.
- Li, J. G., C. Chen and L. Y. Liu-Chen.** 2002. Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50/Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (EBP50/NHERF) blocks U50,488H-induced down-regulation of the human kappa opioid receptor by enhancing its recycling rate. *J Biol Chem* **277**: 27545-52.
- Liepkalns, V. A., J. J. Myher, A. Kuksis, U. Leli, N. Freysz and G. Hauser.** 1993. Molecular species of glycerophospholipids and diacylglycerols of cultured SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biochem Cell Biol* **71**: 141-9.
- Lill, Y., K. L. Martinez, M. A. Lill, B. H. Meyer, H. Vogel and B. Hecht.** 2005. Kinetics of the initial steps of G protein-coupled receptor-mediated cellular signaling revealed by single-molecule imaging. *Chemphyschem* **6**: 1633-40.
- Linnala, A., V. P. Lehto and I. Virtanen.** 1997. Neuronal differentiation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells induces synthesis and secretion of tenascin and upregulation of alpha(v) integrin receptors. *J Neurosci Res* **49**: 53-63.
- Liu, A. P. and D. A. Fletcher.** 2006. Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. *Biophys J* **91**: 4064-70.
- Lober, R. M., M. A. Pereira and N. A. Lambert.** 2006. Rapid activation of inwardly rectifying potassium channels by immobile G-protein-coupled receptors. *J Neurosci* **26**: 12602-8.
- London, E.** 2002. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 480-6.
- Lopez, A., L. Dupou, A. Altibelli, J. Trotard and J. F. Tocanne.** 1988. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments under conditions of uniform disk illumination. Critical comparison of analytical solutions, and a new mathematical method for calculation of diffusion coefficient D. *Biophys J* **53**: 963-70.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-75.

M

- Maggio, R., Z. Vogel and J. Wess.** 1993. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular "cross-talk" between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3103-7.
- Marguet, D., P. F. Lenne, H. Rigneault and H. T. He.** 2006. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J* **25**: 3446-57.
- Marinissen, M. J. and J. S. Gutkind.** 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 368-76.
- Martin, N. A. and P. L. Prather.** 2001. Interaction of co-expressed mu- and delta-opioid receptors in transfected rat pituitary GH(3) cells. *Mol Pharmacol* **59**: 774-83.

- Massotte, D., K. Brillet, B. Kieffer and G. Milligan.** 2002. Agonists activate Gi1 alpha or Gi2 alpha fused to the human mu opioid receptor differently. *J Neurochem* **81**: 1372-82.
- Matesic, D. F., D. R. Manning and G. R. Luthin.** 1991. Tissue-dependent association of muscarinic acetylcholine receptors with guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Mol Pharmacol* **40**: 347-53.
- Maulik, N., V. E. Kagan, V. A. Tyurin and D. K. Das.** 1998. Redistribution of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine precedes reperfusion-induced apoptosis. *Am J Physiol* **274**: H242-8.
- Mayor, S. and F. R. Maxfield.** 1995. Insolubility and redistribution of GPI-anchored proteins at the cell surface after detergent treatment. *Mol Biol Cell* **6**: 929-44.
- McLaughlin, S. and D. Murray.** 2005. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* **438**: 605-11.
- McVey, M., D. Ramsay, E. Kellett, S. Rees, S. Wilson, A. J. Pope and G. Milligan.** 2001. Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta - opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem* **276**: 14092-9.
- Meier, J., C. Vannier, A. Sergé, A. Triller and D. Choquet.** 2001. Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. *Nat Neurosci* **4**: 253-60.
- Meilhac, N., L. Le Guyader, L. Salome and N. Destainville.** 2006. Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **73**: 011915.
- Metcalf, T. N., J. L. Wang and M. Schindler.** 1986. Lateral diffusion of phospholipids in the plasma membrane of soybean protoplasts: Evidence for membrane lipid domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 95-99.
- Meunier, J. C., C. Mollereau, L. Toll, C. Suaudeau, C. Moisand, P. Alvinerie, J. L. Butour, J. C. Guillemot, P. Ferrara, B. Monsarrat and et al.** 1995. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **377**: 532-5.
- Minami, M., T. Onogi, T. Nakagawa, Y. Katao, Y. Aoki, S. Katsumata and M. Satoh.** 1995. DAMGO, a mu-opioid receptor selective ligand, distinguishes between mu- and kappa-opioid receptors at a different region from that for the distinction between mu- and delta-opioid receptors. *FEBS Lett* **364**: 23-7.
- Minnis, J. G., S. Patierno, S. E. Kohlmeier, N. C. Brecha, M. Tonini and C. Sternini.** 2003. Ligand-induced mu opioid receptor endocytosis and recycling in enteric neurons. *Neuroscience* **119**: 33-42.
- Mollereau, C., H. Mazarguil, J. M. Zajac and M. Roumy.** 2005. Neuropeptide FF (NPFF) Analogs Functionally Antagonize Opioid Activities in NPFF2 Receptor-Transfected SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Mol Pharmacol* **67**: 965-75.
- Mollereau, C., M. Parmentier, P. Mailleux, J. L. Butour, C. Moisand, P. Chalon, D. Caput, G. Vassart and J. C. Meunier.** 1994. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* **341**: 33-8.
- Mouledous, L., J. Neasta, S. Uttenweiler-Joseph, A. Stella, M. Matondo, M. Corbani, B. Monsarrat and J. C. Meunier.** 2005. Long-term morphine treatment enhances proteasome-dependent degradation of G beta in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: correlation with onset of adenylate cyclase sensitization. *Mol Pharmacol* **68**: 467-76.

Mumby, S. M., R. O. Heukeroth, J. I. Gordon and A. G. Gilman. 1990. G-protein alpha-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 728-32.

N

Neasta, J., S. Uttenweiler-Joseph, K. Chaoui, B. Monsarrat, J. C. Meunier and L. Mouldous. 2006. Effect of long-term exposure of SH-SY5Y cells to morphine: a whole cell proteomic analysis. *Proteome Sci* **4**: 23.

Nelson, S., R. D. Horvat, J. Malvey, D. A. Roess, B. G. Barisas and C. M. Clay. 1999. Characterization of an intrinsically fluorescent gonadotropin-releasing hormone receptor and effects of ligand binding on receptor lateral diffusion. *Endocrinology* **140**: 950-7.

Nestler, E. J. 1992. Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* **12**: 2439-50.

Neubig, R. R. 1994. Membrane organization in G-protein mechanisms. *Faseb J* **8**: 939-46.

Neubig, R. R., R. D. Gantzog and W. J. Thomsen. 1988. Mechanism of agonist and antagonist binding to alpha 2 adrenergic receptors: evidence for a precoupled receptor-guanine nucleotide protein complex. *Biochemistry* **27**: 2374-84.

Nobles, M., A. Benians and A. Tinker. 2005. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18706-11.

O

Onogi, T., M. Minami, Y. Katao, T. Nakagawa, Y. Aoki, T. Toya, S. Katsumata and M. Satoh. 1995. DAMGO, a mu-opioid receptor selective agonist, distinguishes between mu- and delta-opioid receptors around their first extracellular loops. *FEBS Lett* **357**: 93-7.

Onoprishvili, I., M. L. Andria, H. K. Kramer, N. Ancevska-Taneva, J. M. Hiller and E. J. Simon. 2003. Interaction between the mu opioid receptor and filamin A is involved in receptor regulation and trafficking. *Mol Pharmacol* **64**: 1092-100.

P

Pahlman, S., J. C. Hoehner, E. Nanberg, F. Hedborg, S. Fagerstrom, C. Gestblom, I. Johansson, U. Larsson, E. Lavenius, E. Ortoft and et al. 1995. Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* **31A**: 453-8.

Pak, Y., B. F. O'Dowd, J. B. Wang and S. R. George. 1999. Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **274**: 27610-6.

Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-45.

Pascal, G. and G. Milligan. 2005. Functional complementation and the analysis of opioid receptor homodimerization. *Mol Pharmacol* **68**: 905-15.

- Pheng, L. H., Y. Dumont, A. Fournier, J. G. Chabot, A. Beudet and R. Quirion.** 2003. Agonist- and antagonist-induced sequestration/internalization of neuropeptide Y Y1 receptors in HEK293 cells. *Br J Pharmacol* **139**: 695-704.
- Pierce, K. L., R. T. Premont and R. J. Lefkowitz.** 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 639-50.
- Pike, L. J.** 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**: 655-67.
- Pike, L. J.** 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* **47**: 1597-8.
- Pitcher, J. A., N. J. Freedman and R. J. Lefkowitz.** 1998. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 653-92.
- Poo, M. and R. A. Cone.** 1974. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature* **247**: 438-41.
- Powell, L. D., S. W. Whiteheart and G. W. Hart.** 1987. Cell surface sialic acid influences tumor cell recognition in the mixed lymphocyte reaction. *J Immunol* **139**: 262-70.
- Powell, M. J. D.** 1964. An efficient method for finding the minimum of a function of several variables without calculating derivatives. *Computer Journal* **7**: 155.
- Pralle, A., P. Keller, E. L. Florin, K. Simons and J. K. Horber.** 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* **148**: 997-1008.
- Prather, P. L., A. W. Tsai and P. Y. Law.** 1994. Mu and delta opioid receptor desensitization in undifferentiated human neuroblastoma SHSY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 177-84.
- Pucadyil, T. J., S. Kalipatnapu, K. G. Harikumar, N. Rangaraj, S. S. Karnik and A. Chattopadhyay.** 2004. G-protein-dependent cell surface dynamics of the human serotonin1A receptor tagged to yellow fluorescent protein. *Biochemistry* **43**: 15852-62.

R

- Ramdas, L., R. M. Disher and T. G. Wensel.** 1991. Nucleotide exchange and cGMP phosphodiesterase activation by pertussis toxin inactivated transducin. *Biochemistry* **30**: 11637-45.
- Ramsay, D., E. Kellett, M. McVey, S. Rees and G. Milligan.** 2002. Homo- and hetero-oligomeric interactions between G-protein-coupled receptors in living cells monitored by two variants of bioluminescence resonance energy transfer (BRET): hetero-oligomers between receptor subtypes form more efficiently than between less closely related sequences. *Biochem J* **365**: 429-40.
- Raynor, K., H. Kong, Y. Chen, K. Yasuda, L. Yu, G. I. Bell and T. Reisine.** 1994. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* **45**: 330-4.
- Reinscheid, R. K., H. P. Nothacker, A. Bourson, A. Ardati, R. A. Henningsen, J. R. Bunzow, D. K. Grandy, H. Langen, F. J. Monsma, Jr. and O. Civelli.** 1995. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* **270**: 792-4.
- Reisine, T.** 1990. Pertussis toxin in the analysis of receptor mechanisms. *Biochem Pharmacol* **39**: 1499-504.
- Reynolds, E. S.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**: 208-12.
- Reynolds, L. M., C. F. Dalton and G. P. Reynolds.** 2001. Phospholipid fatty acids and neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett* **309**: 193-6.

- Rietveld, A. and K. Simons.** 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* **1376**: 467-79.
- Rios, C. D., B. A. Jordan, I. Gomes and L. A. Devi.** 2001. G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* **92**: 71-87.
- Rodgers, W. and J. Zavzavadjian.** 2001. Glycolipid-enriched membrane domains are assembled into membrane patches by associating with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* **267**: 173-83.
- Roettger, B. F., D. Ghanekar, R. Rao, C. Toledo, J. Yingling, D. Pinon and L. J. Miller.** 1997. Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *Mol Pharmacol* **51**: 357-62.
- Roumy, M., C. Lorenzo, S. Mazerès, S. Bouchet, J. M. Zajac and C. Mollereau.** 2007. Physical association between neuropeptide FF and micro-opioid receptors as a possible molecular basis for anti-opioid activity. *J Biol Chem* **282**: 8332-42.
- Rouser, G., S. Fkeischer and A. Yamamoto.** 1970. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* **5**: 494-6.
- Rozelle, A. L., L. M. Machesky, M. Yamamoto, M. H. Driessens, R. H. Insall, M. G. Roth, K. Luby-Phelps, G. Marriott, A. Hall and H. L. Yin.** 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* **10**: 311-20.

S

- Sadee, W., V. C. Yu, M. L. Richards, P. N. Preis, M. R. Schwab, F. M. Brodsky and J. L. Biedler.** 1987. Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res* **47**: 5207-12.
- Salamon, Z., V. J. Hruby, G. Tollin and S. Cowell.** 2002. Binding of agonists, antagonists and inverse agonists to the human delta-opioid receptor produces distinctly different conformational states distinguishable by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J Pept Res* **60**: 322-8.
- Salome, L., J. L. Cazeils, A. Lopez and J. F. Tocanne.** 1998. Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. *Eur Biophys J* **27**: 391-402.
- Samama, P., S. Cotecchia, T. Costa and R. J. Lefkowitz.** 1993. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* **268**: 4625-36.
- Samways, D. S. and G. Henderson.** 2006. Opioid elevation of intracellular free calcium: possible mechanisms and physiological relevance. *Cell Signal* **18**: 151-61.
- Sauliere, A., G. Gaibelet, C. Millot, S. Mazerès, A. Lopez and L. Salome.** 2006. Diffusion of the mu opioid receptor at the surface of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is restricted to permeable domains. *FEBS Lett* **580**: 5227-31.
- Saxton, M. J.** 1993. Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion. *Biophys J* **64**: 1766-80.
- Saxton, M. J. and K. Jacobson.** 1997. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **26**: 373-99.
- Schauer, R.** 1985. Sialic acids and their role as biological masks. *TIBS* **10**: 357.
- Schmidt, C. E., A. F. Horwitz, D. A. Lauffenburger and M. P. Sheetz.** 1993. Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J Cell Biol* **123**: 977-91.

- Schootemeijer, A., G. Gorter, L. G. Tertoolen, S. W. De Laat and J. W. Akkerman.** 1995. Relation between membrane fluidity and signal transduction in the human megakaryoblastic cell line MEG-01. *Biochim Biophys Acta* **1236**: 128-34.
- Schuck, S., M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko and K. Simons.** 2003. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5795-800.
- Schutz, G. J., G. Kada, V. P. Pastushenko and H. Schindler.** 2000. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *Embo J* **19**: 892-901.
- Sergé, A., L. Fourgeaud, A. Hemar and D. Choquet.** 2002. Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J Neurosci* **22**: 3910-20.
- Sergé, A., L. Fourgeaud, A. Hemar and D. Choquet.** 2003. Active surface transport of metabotropic glutamate receptors through binding to microtubules and actin flow. *J Cell Sci* **116**: 5015-22.
- Shechter, E.** 2004. Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels.: Dunod
- Sheets, E. D., G. M. Lee, R. Simson and K. Jacobson.** 1997. Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry* **36**: 12449-58.
- Shenoy, S. K., M. T. Drake, C. D. Nelson, D. A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R. T. Premont, O. Lichtarge and R. J. Lefkowitz.** 2006. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* **281**: 1261-73.
- Shenoy, S. K., P. H. McDonald, T. A. Kohout and R. J. Lefkowitz.** 2001. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**: 1307-13.
- Shvartsman, D. E., M. Kotler, R. D. Tall, M. G. Roth and Y. I. Henis.** 2003. Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts. *J Cell Biol* **163**: 879-88.
- Simons, K. and E. Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-72.
- Simons, K. and D. Toomre.** 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-9.
- Simson, R., E. D. Sheets and K. Jacobson.** 1995. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys J* **69**: 989-93.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson.** 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-31.
- Smart, E. J., Y. S. Ying, C. Mineo and R. G. Anderson.** 1995. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10104-8.
- Smith, S. M., Y. Lei, J. Liu, M. E. Cahill, G. M. Hagen, B. G. Barisas and D. A. Roess.** 2006. Luteinizing hormone receptors translocate to plasma membrane microdomains after binding of human chorionic gonadotropin. *C R Acad Sci III* **147**: 1789-95.
- Snook, L. A., G. Milligan, B. L. Kieffer and D. Massotte.** 2006. Mu-delta opioid receptor functional interaction: Insight using receptor-G protein fusions. *J Pharmacol Exp Ther* **318**: 683-90.
- Snyder, S. H. and G. W. Pasternak.** 2003. Historical review: Opioid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **24**: 198-205.

- Sonnenfeld, K. H. and D. N. Ishii.** 1985. Fast and slow nerve growth factor binding sites in human neuroblastoma and rat pheochromocytoma cell lines: relationship of sites to each other and to neurite formation. *J Neurosci* **5**: 1717-28.
- Soumpasis, D. M.** 1983. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J* **41**: 95-7.
- Stanasila, L., D. Massotte, B. L. Kieffer and F. Pattus.** 1999. Expression of delta, kappa and mu human opioid receptors in *Escherichia coli* and reconstitution of the high-affinity state for agonist with heterotrimeric G proteins. *Eur J Biochem* **260**: 430-8.
- Standifer, K. M. and G. W. Pasternak.** 1997. G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cell Signal* **9**: 237-48.
- Stein, P. E., A. Boodhoo, G. D. Armstrong, S. A. Cockle, M. H. Klein and R. J. Read.** 1994. The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**: 45-57.
- Sternini, C., M. Spann, B. Anton, D. E. Keith, Jr., N. W. Bunnett, M. von Zastrow, C. Evans and N. C. Brecha.** 1996. Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9241-6.
- Struck, D. K. and R. E. Pagano.** 1980. Insertion of fluorescent phospholipids into the plasma membrane of a mammalian cell. *J Biol Chem* **255**: 5404-10.
- Suzuki, K., K. Ritchie, E. Kajikawa, T. Fujiwara and A. Kusumi.** 2005. Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophys J* **88**: 3659-80.

T

- Tang, Q. and M. Edidin.** 2003. Lowering the barriers to random walks on the cell surface. *Biophys J* **84**: 400-7.
- Tang, W. J. and A. G. Gilman.** 1991. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science* **254**: 1500-3.
- Taylor, C. M., T. Coetzee and S. E. Pfeiffer.** 2002. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane. *J Neurochem* **81**: 993-1004.
- Tegeder, I. and G. Geisslinger.** 2004. Opioids as modulators of cell death and survival--unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev* **56**: 351-69.
- Tian, W. N., E. Duzic, S. M. Lanier and R. C. Deth.** 1994. Determinants of alpha 2-adrenergic receptor activation of G proteins: evidence for a precoupled receptor/G protein state. *Mol Pharmacol* **45**: 524-31.
- Tocanne, J. F., L. Dupou-Cézanne and A. Lopez.** 1994. Lateral diffusion of lipids in model and natural membranes. *Prog Lipid Res* **33**: 203-37.
- Tolkovsky, A. M., S. Braun and A. Levitzki.** 1982. Kinetics of interaction between beta-receptors, GTP protein, and the catalytic unit of turkey erythrocyte adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 213-7.
- Tsao, P. and M. von Zastrow.** 2000. Downregulation of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Neurobiol* **10**: 365-9.
- Twitchell, W. A. and S. G. Rane.** 1994. Nucleotide-independent modulation of Ca(2+)-dependent K⁺ channel current by a mu-type opioid receptor. *Mol Pharmacol* **46**: 793-8.

V

- Van Rheenen, J., E. M. Achame, H. Janssen, J. Calafat and K. Jalink.** 2005. PIP2 signaling in lipid domains: a critical re-evaluation. *Embo J* **24**: 1664-73.
- Vaz, W. L., M. Criado, V. M. Madeira, G. Schoellmann and T. M. Jovin.** 1982a. Size dependence of the translational diffusion of large integral membrane proteins in liquid-crystalline phase lipid bilayers. A study using fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **21**: 5608-12.
- Vaz, W. L., Z. Derzko and K. Jacobson.** 1982b. Photobleaching measurements of the lateral diffusion of lipids and proteins in artificial phospholipid bilayer membranes, p. 83-136. In G. Poste and G. L. Nicolson, (ed.), *Membrane reconstitution*: Elsevier Biomedical Press.
- Vereb, G., J. Szollosi, J. Matko, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Matyus, T. A. Waldmann and S. Damjanovich.** 2003. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8053-8.
- Vergne, I. and L. Cézanne.** 1999. Alteration of the lateral organization of the plasma membrane of Chinese hamster ovary cells by synthetic lipopeptide, Pam3Cys-Ser-Lys4. *Eur J Biochem* **264**: 369-73.
- Volker, H., R. Schweisfurth and P. Hirsch.** 1977. Morphology and ultrastructure of *Crenothrix polyspora* Cohn. *J Bacteriol* **131**: 306-13.
- von Zastrow, M., A. Svingos, H. Haberstock-Debic and C. Evans.** 2003. Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs. *Curr Opin Neurobiol* **13**: 348-53.

W

- Wakatsuki, T., B. Schwab, N. C. Thompson and E. L. Elson.** 2001. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci* **114**: 1025-36.
- Wallach, D. F. H. and V. B. Kamat.** 1966. Preparation of plasma-membrane fragments from mouse ascites tumor cells. *Methods in Enzymology* **8**: 164.
- Wang, W. W., M. Shahrestanifar, J. Jin and R. D. Howells.** 1995. Studies on mu and delta opioid receptor selectivity utilizing chimeric and site-mutagenized receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12436-40.
- Wawrezynieck, L.** 2006. Confinement moléculaire et organisation de la membrane des cellules vivantes : analyse de la diffusion par spectroscopie de corrélation de fluorescence. Marseille: Université Aix-Marseille II
- Wawrezynieck, L., H. Rigneault, D. Marguet and P. F. Lenne.** 2005. Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys J* **89**: 4029-42.
- Whistler, J. L., H. H. Chuang, P. Chu, L. Y. Jan and M. von Zastrow.** 1999. Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* **23**: 737-46.
- Whistler, J. L. and M. von Zastrow.** 1998. Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9914-9.
- White, J. and E. Stelzer.** 1999. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol* **9**: 61-5.
- White, J. H., A. Wise, M. J. Main, A. Green, N. J. Fraser, G. H. Disney, A. A. Barnes, P. Emson, S. M. Foord and F. H. Marshall.** 1998. Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**: 679-82.

- Wong, Y. H., B. R. Conklin and H. R. Bourne.** 1992. Gz-mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation. *Science* **255**: 339-42.
- Wrigglesworth, J. M., L. Packer and D. Branton.** 1970. Organization of mitochondrial structure as revealed by freeze-etching. *Biochim Biophys Acta* **205**: 125-35.

4

- Yeichiel, E. and M. Edidin.** 1987. Micrometer-scale domains in fibroblast plasma membranes. *J Cell Biol* **105**: 755-60.
- Yu, V. C., S. Eiger, D. S. Duan, J. Lamah and W. Sadee.** 1990. Regulation of cyclic AMP by the mu-opioid receptor in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* **55**: 1390-6.
- Yu, V. C. and W. Sadee.** 1988. Efficacy and tolerance of narcotic analgesics at the mu opioid receptor in differentiated human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **245**: 350-5.
- Yu, X., X. Mao, A. D. Blake, W. X. Li and S. L. Chang.** 2003. Morphine and endomorphins differentially regulate micro-opioid receptor mRNA in SHSY-5Y human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 447-54.
- Yu, Y., L. Zhang, X. Yin, H. Sun, G. R. Uhl and J. B. Wang.** 1997. Mu opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy. *J Biol Chem* **272**: 28869-74.

Z

- Zadina, J. E., L. M. Harrison, L. J. Ge, A. J. Kastin and S. L. Chang.** 1994. Differential regulation of mu and delta opiate receptors by morphine, selective agonists and antagonists and differentiating agents in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 1086-96.
- Zhang, J., S. S. Ferguson, L. S. Barak, S. R. Bodduluri, S. A. Laporte, P. Y. Law and M. G. Caron.** 1998. Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7157-62.
- Zhang, N. and J. J. Oppenheim.** 2005. Crosstalk between chemokines and neuronal receptors bridges immune and nervous systems. *J Leukoc Biol* **78**: 1210-4.
- Zhang, Y. Q. and L. E. Limbird.** 2004. Hetero-oligomers of alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors do not lead to transactivation of G-proteins or altered endocytosis profiles. *Biochem Soc Trans* **32**: 856-60.

ANNEXES

Matériels et Méthodes

Milieus utilisés

DMEM : Milieu utilisé pour la culture des cellules. Contient les nutriments nécessaires aux cellules, ainsi que des antibiotiques pour empêcher la présence de bactéries et maintenir la pression de sélection (cellules transfectées uniquement).

→ DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO n° 21969) additionné de 10% de SVF (Sérum de veau fœtal, Gibco), 0.05 mg/mL de gentamicine (Gibco), 2 mM de glutamine (Eurobio).

Le milieu des cellules transfectées contient en plus 0,4 mg/mL de généticine (Gibco).

*DMEM** : Milieu utilisé pour la préparation des colloïdes et l'observation en SPT. Le rouge de phénol, fluorescent, est remplacé par de l'Hepes, les antibiotiques ne sont pas nécessaires car ce milieu est utilisé sur les cellules ponctuellement.

→ DMEM sans rouge de phénol (Gibco, n° 31053-028), additionné de 2mM de glutamine, 10% de SVF et 10 mM d'Hepes (Sigma).

DMEM-H : Milieu utilisé pour la dilution de la cytochalasine D. Le SVF est supprimé car il interfère avec la CD, les autres nutriments et antibiotiques ne sont pas nécessaires car ce milieu est utilisé sur les cellules ponctuellement.

→ DMEM sans rouge de phenol additionné de 10 mM d'Hepes

PBS : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Eurobio) :

PBS⁺ : PBS avec Ca²⁺ Mg²⁺ (CS1PBS00-01)

PBS⁻ : PBS sans Ca²⁺ Mg²⁺ (CS1PBS01-01)

Les solvants utilisés proviennent de la société SDS (Val de Reuil, France).

Tampon TRIS / EDTA : TRIS (Merck) 50 mM ; EDTA 1 mM ; pH 7,4

Cellules

La construction du plasmide et la transfection des cellules sont décrites dans Saulière *et coll.*, 2006 (cf. annexe).

Entretien

Les cellules SH-SY5Y sont cultivées en boîte de Pétri (diamètre 100 mm, VWR international) dans du milieu DMEM et maintenues dans une étuve en atmosphère humide à

37°C en présence de 5% de CO₂. Les passages sont effectués deux fois par semaine par décollement des cellules (trypsine / EDTA 1,5 mM, 3 minutes à 37°C), dilution au ¼, puis remise en culture. Pour les observations en microscopie environ 50 000 cellules sont déposées sur des lamelles 22*22 mm (Erie Scientific COmpany ESCO), dans des boîtes de Pétri de 40 mm de diamètre, au moins deux jours avant utilisation.

Congélation

Les cellules d'une boîte à confluence sont décollées, reprises dans leur milieu puis culottées par une centrifugation à 400g pendant 5 minutes. Sur le culot cellulaire est ajouté 0,9 mL de milieu pour cellules sauvages et 0,1 mL de DMSO, ce mélange est alors mis dans un cryotube rapidement placé au frigidaire pendant 1h puis au congélateur à -80°C toute la nuit, et enfin conservé dans le container d'azote liquide (-270°C).

Décongélation des cellules

Les cryotubes sont mis à réchauffer rapidement au bain-marie (37°C) puis repris dans 5 mL de DMEM préalablement mis à 37°C.

Test de survie cellulaire

Le but est de surveiller la survie des cellules juste après les différents traitements utilisés, mais également après 24h et 48h. Les cellules sontensemencées 48 h avant l'expérience dans des plaques 24 puits, à raison de 100 000 cellules par puits environ. Chaque condition nécessite 6 puits (P_{0h}, P_{24h} et P_{48h}, chacun en double), et des puits sans traitements sont conservés comme témoins. Les drogues (ici la toxine pertussique et la cytochalasine D) sont ajoutées dans tous les puits en même temps à t = 0, dans les conditions de concentrations, de temps et de température utilisées lors des expériences. Les puits P_{0h} sont traités, de suite après les drogues, par ajout de 400 µL de Trypan par puits (dilution par 5 dans du PBS⁺ de la solution stock, Sigma à 0,4%), pendant 5 minutes à température ambiante. Après lavage au PBS⁺ les cellules sont observées au microscope, et les noyaux colorés par le Trypan (cellules mortes) comptés. Les drogues présentes dans les puits P_{24h} et P_{48h} sont rincées et les cellules remises à 37°C dans du DMEM. Après 24 ou 48h elles sont également traitées au Trypan et les noyaux colorés comptés. Le nombre de cellules mortes dans les puits avec traitement est comparé au nombre de cellules mortes dans les puits témoins correspondant.

Membranes

Préparation de membranes totales

Les cellules de 20 boîtes (diamètre 100 mm) sont décollées par ajout de 5 mL de PBS⁻ / EDTA (1,5 mM), à 37°C pendant 20 minutes. Elles sont ensuite regroupées par groupe de 10 boîtes dans un falcon et culottées par centrifugation (200 g, 5 minutes). Le culot de cellules correspondant à 10 boîtes est repris dans 15 mL de tampon TRIS / EDTA avec un cachet d'anti-protéase (Complete Mini, Roche Diagnostics), et lysé par le procédé de cavitation d'azote ((Wallach, 1966), 10 min. à 30 atmosphères). Les noyaux et les cellules non lysées sont culottés par une centrifugation de 10 minutes à 500 g. Le surnageant est alors repris et centrifugé 40 minutes à 100 000 g. Le culot de membrane ainsi obtenu est repris dans 1 mL de TRIS / EDTA, puis congelé à -80°C après homogénéisation.

Extraction de lipides

Elle est réalisée selon le protocole de Bligh et Dyer (Bligh, 1959). Brièvement les cellules décollées par le PBS⁻ / EDTA (1,5 mM, 30 min., 37°C) sont culottées par centrifugation (400 g, 5 minutes) puis reprises dans un mélange méthanol / chloroforme / eau (2 / 1 / 0.8 v/v/v), et régulièrement agité pendant 1 h d'attente à 22°C. Un mélange de chloroforme et d'eau (1/1 v/v) est alors ajouté sur l'échantillon, qui est agité puis centrifugé à 1000 g pendant 10 minutes, la phase chloroformique contenant les lipides est alors retirée. La dernière étape est répétée 2 à 3 fois pour extraire complètement les molécules hydrophobes. Les lipides sont conservés secs à -20°C.

Chromatographie sur couche mince

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur des plaques de silice (Kieselgel 60, Merck). Les échantillons sont déposés en bas de la plaque en présence de témoins. La plaque est déposée dans une cuve, et la migration s'effectue dans un mélange chloroforme / méthanol / acide acétique / eau (65/25/20/4) à température ambiante. Les taches sont révélées par vapeur d'iode et délimitées, la silice correspondant à chaque tache est ensuite grattée. Les différents échantillons sont dosés par dosage phosphore (non perturbé par la présence de silice).

Préparation des DRM

Préalablement au dépôt sur gradient de saccharose les membranes sont incubées, ou non, avec les agonistes DAMGO et morphine, pendant 1 heure à 25°C. 1 mL de préparation

membranaire (à 7 mg de protéines / mL) est déposé au fond d'un tube à ultracentrifugation de 15 mL (Ultraclear Beckman). Le Triton X-100 (Fluka, n° 93420) est rajouté pour une concentration finale de 0,25 %. L'échantillon est laissé à incuber 20 minutes dans la glace. Le gradient de saccharose est ensuite mis en place par ajout de 1 mL de saccharose à 70 % (w/v), puis 4 mL à 30 % et enfin 4 mL à 5%. Le gradient est centrifugé à 200 000 g pendant 18 h à 4°C (rotor Beckman SW41). 8 fractions de 1,2 mL sont ensuite collectées du haut vers le bas. Sur chaque fraction la turbidité à 620 nm, le pourcentage de saccharose, la quantité de protéines et l'activité spécifique de la phosphatase alcaline (Enzymatic kit ALP 20, Sigma) sont mesurées. Les DRM correspondent généralement aux fractions 3 à 5. La fluorescence due à l'EGFP est également mesurée sur chaque fraction.

Western blot

Les aliquots (DRM, fractions solubilisées ou membrane totale) sont suspendus dans du tampon de Laemmli (Tris-HCl 50mM, SDS 0,8% (w/v), glycérol 4% (v/v), β -mercaptoethanol 0,2% (v/v), bleu de bromophenol ; pH 6,8) auquel est rajouté 4 M d'urée. Les échantillons sont maintenus à 100°C pendant 5 minutes puis déposés sur un gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide. Après électro-transfert en milieu aqueux la membrane de nitrocellulose (Hybond ECL, Amersham) est bloquée pendant 1 h à 22°C dans un tampon Tris-HCl 20mM, NaCl 125 mM, à pH 7,6 contenant en plus du Tween20 à 0,1% (v/v) et de la poudre de lait à 5% (w/v). L'immunodetection est réalisée avec un anticorps anti-T7 HRP conjugué (dilution 1/5000, Novagen) incubé une nuit à 4°C. Après plusieurs lavages par le tampon de blocage (sans la poudre de lait), la membrane est révélée avec le réactif luminescent adéquat (chemiluminescence reagent plus, Perkin Elmer Life Sciences, Inc.).

Dosages

Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol s'effectue selon un protocole dérivé de celui décrit par Courchaine (Courchaine, 1959). Brièvement 1,5 mL d'acide acétique est ajouté sur les échantillons préalablement séchés, puis, après homogénéisation, 1 mL d'un mélange FeCl₃ (solution stock 2.5 mg dans 100 mL d'acide ortho phosphorique) et H₂SO₄ (4/50 v/v). Ce dosage s'effectue par comparaison avec une gamme étalon de cholestérol (Sigma, de 0 à 100 μ g). Après homogénéisation la DO est mesurée à 550 nm.

Dosage du phosphore

Le dosage du phosphore est dérivé du protocole établi par Rouser (Rouser, 1970). La gamme étalon est faite avec du phosphore minéral ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2 \text{ H}_2\text{O}$; de 25 à 125 nmol) et le blanc avec de l'eau ultra-pure (Millipore). 260 μL d'acide perchlorique à 70 % sont ajoutés sur les échantillons secs puis les tubes sont maintenus, bouchés avec des billes de verre, à 180°C pendant 20 minutes (à compter de l'apparition des vapeurs d'acides). Sur les échantillons revenus à température ambiante 0,4 mL d'ascorbate (Sigma, 5% poids/volume) et 0,4mL de molybdate d'ammonium (Fluka, 1,25% poids/volume) sont ajoutés. Enfin les tubes sont chauffés 5 minutes dans l'eau bouillante, la réaction est stoppée dans un bain de glace et la DO mesurée à 660 nm.

Dosage des protéines

Les concentrations en protéines sont mesurées par la méthode de Lowry (Lowry, 1951) en comparaison avec une gamme de BSA (Sigma). Sur l'échantillon (QSP 100 μL avec de l'eau ultra-pure) est ajouté 1 mL de solution C, puis après homogénéisation et 30 minutes d'attente à 22°C, 100 μL de réactif de Folin (dilué au 1/2, Sigma). Après 30 minutes d'incubation à 22°C la DO est mesurée à 650 nm.

(*Solution A* : 2% NaCO_3 dans 0.1N NaOH ; *Solution B1* : 1% $\text{CuSO}_4 \text{ H}_2\text{O}$; *Solution B2* : 2% Tartrate de sodium; *Solution C* : 1 volume de A + 1% B1 + 1% B2)

Pharmacologie

Expérience de liaison directe et indirecte (binding)

Les expériences de saturation sont réalisées dans un volume final de 500 μL contenant les aliquots membranaires (environ 20 et 200 μg de protéines, respectivement pour les cellules transfectées ou sauvages), et le ligand radio marqué (DAMGO ou DPN tritiée) aux concentrations voulues (0,1 à 4 nM), dans un tampon TRIS / HCl (pH 7.4). La liaison non spécifique est mesurée en large excès de ligand froid. Dans les expériences de liaison indirecte la morphine, ou le CTAP, sont ajoutés à des concentrations croissantes (de 4 nM à 0,2 μM) en compétition avec la DPN tritiée (1 nM).

Les échantillons sont ensuite incubés à 25°C pendant 1h, puis filtrés sur membrane GF/B Whatman (préalablement imbibés de polyéthylèneimine à 0.03% pendant 2h). Après lavage (3 fois avec du Tris/HCl 10 mM pH 7.4) la radioactivité présente sur le filtre est comptée dans 3 mL de scintillant Ready Protein+, dans un compteur Tri-Card 2100TR (Packard).

Les résultats sont analysés sous Prism (GraphPad Software). La constante de dissociation à l'équilibre (K_D) est obtenue à partir de l'hyperbole : $[B] = \frac{B_{\max} K_D}{[F] + K_D}$

Où F (Free) le ligand libre est assimilé au ligand total, B (Bound) représente la quantité de ligand lié et Bmax la densité maximale de sites spécifiques.

La constante d'inhibition (K_i) est obtenue à partir de la courbe : % d'inhibition = f (log [F]). Elle correspond à la concentration de ligand froid nécessaire pour occuper la moitié des sites (Cheng, 1973).

Mesure de l'inhibition de l'adénylate cyclase

L'inhibition de la production d'AMPC par le DAMGO ou la morphine (de 1 à 10^{-5} μ M) est observée sur cellules, selon le protocole décrit par Capeyrou *et coll.* (Capeyrou, 1997). La veille de l'expérience les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 150 000 cellules par puits. Le jour même les cellules sont rincées, puis incubées, à 37°C, 2 heures avec 200 μ L de milieu contenant 2 μ L d'Adénine froide (10^{-4} M, Sigma) et 0,6 μ L d'adénine tritiée (1 μ Ci/ μ L). Après un lavage au KRH, les cellules sont mises en présence de 50 μ M de forskoline (Sigma), ainsi que des concentrations voulues de ligand et des inhibiteurs de phosphodiesterases (IBMX et Ro20-1724, Sigma) dans du tampon KRH. Après 10 minutes à 37°C les cellules sont lysées par ajout de 200 μ L de HCl 2,2 N. Le volume de chaque puits est ensuite déposé sur une colonne d'alumine (0,65 g, Sigma). Les colonnes sont lavées avec 5 mL d'HCl 5 mM puis avec 500 μ L d'acétate d'ammonium 0,1 M. L'AMPC est alors éluee par ajout de 3 mL d'acétate d'ammonium 0,1 M et comptée dans 9 mL de scintillant Ready Protein+, dans un compteur Tri-Card 2100TR (Packard).

KRH : KCL 5 mM ; MgSO₄ 2,5 mM ; NaCl 125 mM ; Hepes 25 mM ; Glucose 8 mM ; KH₂PO₄ 1,25 mM ; CaCl₂ 1,5 mM ; BSA 0,5 mg/mL.

Drogues et marquages

Neuraminidase

Les lamelles, préalablement lavées avec du PBS⁺, sont mises à incuber 30 minutes à 37°C en présence de 80 μ L de neuraminidase à 0,1 U/mL (Calbiochem / Sigma-Aldrich, diluée dans du PBS⁺). Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS⁺ avant utilisation.

Toxine pertussique

La toxine pertussique (Sigma-Aldrich, produite dans *Bordetella Pertussi*) est ajoutée la veille de l'expérience à une concentration finale de 100 ng/mL dans du milieu DMEM pour cellules sauvages, à raison de 1 mL par boîte (diamètre 40 mm) et de 200 µL par puits (diamètre 12 mm) lors des expériences de cyclase.

Cytochalasine D

Les cellules sont lavées avec du PBS⁺ puis mises en présence de 500 µL de cytochalasine D (Sigma, produite dans *Zygosporium masonii*) à 5 µM (dilution dans du DMEM-H). L'incubation dure 30 minutes à 37°C, les cellules sont ensuite lavées et prête pour l'observation.

Marquage de l'actine

Les cellules, préalablement lavées avec du DMEM, sont fixées par du PFA à 3,7% pendant 30 minutes à 22°C. Elles sont ensuite lavées (4 X) avec du PBS⁻ puis perméabilisées par du Triton X100 (Fluka) à 0,3% (10 minutes, 22°C) puis lavées, et incubées avec la phalloïdine rhodamine (Sigma 1/1000, 30 minutes, 22°C). Après trois derniers lavages les lamelles sont montées sur lame et observées.

Immunomarquage

L'accessibilité du T7 par les anticorps a été vérifiée par immunomarquage. Les anticorps sont dilués dans du DMEM*, et les lavages sont effectués avec ce milieu. Les cellules sont lavées puis incubées 20 minutes à 22°C avec 90 µL de l'anticorps monoclonal anti-T7 (Novagen) à 15 µg/mL. Après trois lavages la seconde incubation est réalisée avec l'anticorps secondaire anti-mouse marqué TRITC (Sigma, 20 minutes, 22°C). La lamelle est alors lavée trois fois, montée sur lame et observée.

Divers

Préparation de multi-couches de lipides

25 nmol de lipides fluorescent sont mélangés avec 2,7 µmol de POPC puis séchés sous flux d'azote jusqu'à obtention d'environ 120 µL de solution. Ils sont alors déposés de manière homogène sur une lame sèche, préalablement lavée à l'éthanol, par dépôts successifs d'environ 40µL. Chaque dépôt est séché par flux d'air chaud sous la lame, cette dernière est placée pendant 2 à 3 h au dessiccateur sous vide (1 Torr) après dépôt total de l'échantillon.

Les lipides sont ensuite réhydratés pendant 2 minutes avec 60µL d'eau, puis « écrasés » par une lamelle (24*36 mm), elle-même scellée par du vernis.

Préparation de para-formaldéhyde (PFA)

La poudre de PFA (Sigma, toxique) est resuspendue dans du PBS⁻ pour une concentration finale de 7.4% (poids/volume). Cette solution est alors chauffée au bain-marie à une température de 80°C sous une agitation régulière. S'il reste des cristaux après 15 à 20 minutes il faut alors ajouter une à deux gouttes de NaOH (1 N), si cela ne suffit pas à les dissoudre la solution doit être filtrée avant d'être utilisée. Après vérification du pH (7,4) la solution doit être maintenue dans la glace (utilisation immédiate) ou congelée à -20°C. Les dilutions ultérieures se font dans du PBS⁻.

Effets des ligands

Les cellules sont traitées avec le ligand choisi à 1 µM (conditions saturantes) pendant 10 à 30 minutes à 22°C ou à 37°C, puis montées entre lame et lamelle en présence du ligand. Les observations ont été faites sur le microscope du SPT (décrit p. 58).

Montage de la lamelle sur une lame

Une cale de parafilm est déposée sur la lame, préalablement lavée à l'éthanol, permettant la formation d'un puits dans lequel 60 µL de DMEM* sont déposés. La lamelle est alors retournée (cellules vers le puits) sur ce montage puis séchée délicatement par du papier et scellée avec du vernis. Lorsque ce dernier est sec la lamelle est placée sous le microscope et les cellules sont observées pour une durée maximum d'1 heure.

Insertion de lipides dans la membrane des cellules

Les lipides utilisés (C₁₂-PE-NBD, synthétisés dans l'équipe) sont repris dans un mélange chloroforme/méthanol (9/1 v/v). Un spectre d'absorption du NBD est réalisé pour en déterminer la concentration, selon la loi de Beer-Lambert : $A = \epsilon l C$ où A est l'absorbance maximale, ϵ le coefficient d'absorption molaire ($\epsilon_{\text{NBD}} = 21067 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), l la longueur de la cuve et C la concentration. 0,4 µmol de lipides sont prélevés, séchés sous flux d'azote puis repris dans 100 µL d'éthanol. Cette solution est ensuite diluée dans 10 mL de PBS⁻. Les cellules, préalablement lavées, sont incubées avec 500 µL de cette solution à 40 µM pendant 10 minutes à température ambiante. Après lavage les lamelles peuvent être montées sur lame et observées.

Colloïdes

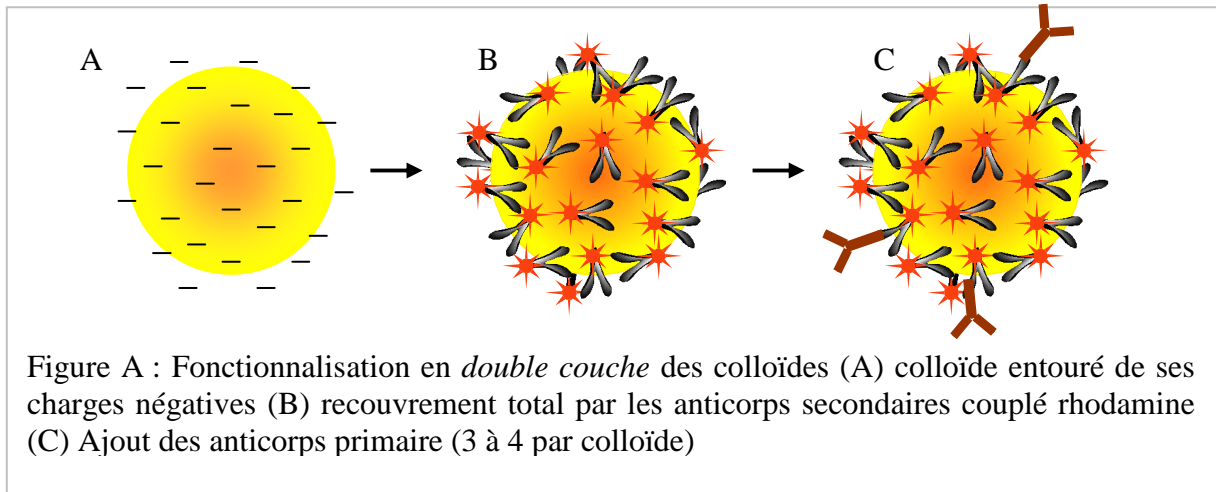
Détermination de la concentration stabilisatrice minimale

La concentration stabilisatrice minimale est la plus petite concentration de protéines permettant d'éviter la floculation des colloïdes (diamètre 40 ± 7 nm, 9.10^{10} particules / mL, British Biocell International), elle doit être déterminée pour chaque protéine. Le culot de particules (centrifugation 9000g, 10min) est resuspendu avec les différentes dilutions de protéine à tester puis incubé 1 heure à 4°C. A l'issue de l'incubation du NaCl est rajouté (1% en masse, concentration finale) pour provoquer la floculation des colloïdes instables. La première concentration en protéines qui permet de garder la solution de colloïdes rose est dite *concentration stabilisatrice* et correspond à un recouvrement total de la surface des colloïdes.

Fonctionnalisation « en double couche » des colloïdes d'or

Le protocole utilisé précédemment pour la fonctionnalisation des particules consistait à les recouvrir d'un mélange BSA / anticorps anti-T7, ces derniers étant présents en quantité minimale (Daumas, 2002). Des problèmes rencontrés lors des expériences de suivi de particule unique ont conduits à une modification de la fonctionnalisation des colloïdes qui sont dès lors fonctionnalisés avec deux *couches*. Ils sont d'abord recouverts entièrement d'anticorps secondaires (Anti-IgG de souris couplé à la rhodamine, Calbiochem), puis l'anticorps anti-T7 de souris (Novagen, VWR International) est rajouté en quantité minimale, et constitue la seconde épaisseur (fig. A).

Les colloïdes d'or sont centrifugés à 9000g, pendant 10 minutes puis le surnageant est remplacé par le même volume de solution d'anticorps secondaire à 12 µg/mL (concentration stabilisatrice minimale) dans du tampon Borax (25 mM, pH 9,0 ; Sigma-Aldrich). Après une heure d'incubation à 4°C la solution de colloïdes est centrifugée à 9000 g pendant 5 minutes et le surnageant remplacé par du DMEM*. Enfin suite à une nouvelle centrifugation (9000 g, 5min.) le culot de colloïdes est remis en suspension dans une solution d'anticorps primaire monoclonal, à 0,08 µg/mL (dilué dans du DMEM*). Après une nouvelle heure d'incubation à 4°C, les colloïdes sont lavés deux fois avec du DMEM* (centrifugation 9000 g, 5 min / remise en suspension). Toutes les solutions utilisées sont maintenues à 4°C. Si nécessaire, les colloïdes sont soniqués à chaque étape pour les remettre en suspension. La solution de colloïdes doit rester rose à chaque étape.



Rq : Les dilutions de l'anticorps primaire, et les lavages intermédiaires, étaient d'abord effectués dans du Borax pH 9, avant d'être remplacé par le DMEM* dans le protocole final.

Les cellules, préalablement traitées à la neuraminidase, sont incubées avec 60 μL de colloïdes fonctionnalisés pendant 15 minutes à 22°C. La lamelle est alors montée sur une lame dans du DMEM*.

Pour l'analyse des colloïdes immobiles, les colloïdes fonctionnalisés sont immobilisés dans un gel de polyacrylamide entre lame et lamelle, avant observation.

FRAP

Conditions d'expériences

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles deux à trois jours avant l'expérience de telle sorte à obtenir des amas bien séparés et un maximum de cellules individualisées. Il est important que les cellules analysées un même jour soient du même âge. L'expérience se fait de préférence sur un jour, au maximum sur deux jours consécutifs. Une lamelle est conservée au maximum une heure à température ambiante, et suffit à l'étude d'un rayon (une lamelle par condition et par rayon). Quatre rayons au minimum sont utilisés à chaque expérience. Vingt cinq à trente-cinq retours de fluorescence sont enregistrés par rayon. Les cellules choisies sont de préférence isolées, ou en périphérie de petits amas. Dû à la morphologie très étalée des cellules, le laser est appliqué sur la zone centrale, plus large. Des cellules témoins sont utilisées en parallèle de chaque condition, après une incubation comparable à celle des cellules testées (même température et même temps d'incubation, réalisées dans du PBS).

La fluorescence est vérifiée directement par l'intermédiaire du photomultiplicateur et non aux oculaires pour éviter au maximum l'illumination du fluorophore. La valeur obtenue à

l'écran doit être au minimum de -4 Volts, tout en ne dépassant pas une mise sous tension du PM de 1800 Volts. Il est conseillé de garder une valeur initiale de fluorescence constante autant que possible, au sein d'un même rayon. La puissance du laser peut être modulée de 20 mW à 40 mW, et différents atténuateurs (x2, x4, x10) peuvent être rajouté sur les trajets optiques (principal et secondaire), enfin le temps de dégradation du fluorophore varie classiquement de 20 msec à 40 msec. Pendant le photo-blanchiment l'obturateur du PM est fermé avec un différentiel de 4 msec pour éviter tout « aveuglement » de ce dernier.

Peltier

Pour les études à 14°C et à 37°C un système de modification de température a été remis en fonctionnement. La lame est posée sur un support en métal, entouré de deux Peltiers. Un ventilateur est placé au dessus de chaque Peltier pour le refroidir (quand il chauffe) et enlever la buée (quand il refroidit). Un abaque a été réalisé en plaçant une sonde de température entre lame et lamelle, de manière à comparer la température demandée et celle ressentie par les cellules. Il est représenté ci-dessous. Après mise à température de l'appareillage les cellules sont maintenues 10 minutes à cette température avant observation.

T° demandée	T° affichée Peltier	T° sonde (réelle)
4	5	9
5	5,9	9,6
7	7,6	11,3
9	9,7	13
10	10,4	13,3
12	12,4	15,3
14	14,2	17
16	16,1	18,8
18	18	20,6
20	20	22,5
22	21,9	24
24	23,8	25,7
26	25,7	27,5
28	27,6	29,2
30	29,6	31
32	31,5	33,4
34	33,4	35,2
37	36,3	38
40	39,3	40,9
45	44,1	45,4

Tableau de correspondance des températures du Peltier :

La première colonne correspond à la température que l'on demande au Peltier d'atteindre, la seconde correspond à la valeur indiquée par le Peltier, la dernière colonne correspond à la température de la sonde placée entre lame et lamelle (température souhaitée)

Les deux lignes en gras sont les températures classiquement utilisé lors de ce travail

Microscopie électronique (réalisée par Nacer Benmeradi au plateau technique de l'IEFG)

Les cellules sur lamelles sont fixées en deux temps. La première fixation est faite dans un bain de glutaraldehyde 1% dans un tampon cacodylate de sodium 0,2 M pH 7,4 à température ambiante, pendant deux heures. Après un lavage rapide au tampon cacodylate, nous procédons à la seconde fixation. Cette dernière est faite dans du tetroxyde d'osmium 0,5 % dans du tampon cacodylate de Na 0,2M pH 7,4 durant 30 mn à 4°C. Les cellules sont alors déshydratées par l'éthanol en bains successifs de 5 minutes, doublés à chaque étape. Les concentrations successives sont de 30, 50, 70, 90 et 100 % d'éthanol. Les cellules sont ensuite imprégnées dans une résine type EPON812 puis incluses dans des gélules et coupées à l'ultra-microtome 60 nm d'épaisseur. Les coupes ultrafines sont contrastées à l'acétate d'uranyle puis au citrate de plomb selon (Reynolds, 1963). L'observation se fait au microscope électronique à transmission JEOL 120 ex, les images à la camera numérique AMT.

PUBLICATIONS
soumises à comité de lecture

A)

Diffusion of the mu opioid receptor at the surface of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is restricted to permeable domains.

Sauliere, A., G. Gaibelet, C. Millot, S. Mazerès, A. Lopez and L. Salomé.

2006, *FEBS Lett* **580**: 5227-31.

B)

Functional membrane diffusion of G-protein coupled receptors

Aurélie Baker*, Aude Saulière*, Fabrice Dumas, Claire Millot, Serge Mazères,
André Lopez, Laurence Salomé

Eur Biophys J, in press

Diffusion of the mu opioid receptor at the surface of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is restricted to permeable domains

Aude Saulière, Gérald Gaibelet, Claire Millot, Serge Mazères, André Lopez, Laurence Salomé*

Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale (UMR CNRS 5089), 205, route de Narbonne, 31077 TOULOUSE cedex, France

Received 16 June 2006; accepted 17 August 2006

Available online 5 September 2006

Edited by Irmgard Sinning

Dedicated to the memory of Laurence Cézanne who initiated this work

Abstract Previous single-molecule studies have shown a long-term diffusion superimposed to a short-term confinement of the human mu opioid (hMOP) receptors at the surface of heterologous cells. However, additional ensemble average measurements are required to reach a complete understanding of the undergoing process. Here, we analyse, by fluorescence recovery after photobleaching measurements, the lateral diffusion of fully functional T7-EGFP-hMOP receptors in neuroblastoma SH-SY5Y cells naturally expressing a low level of the wild-type receptor. Experiments carried out at variable observation radii demonstrate the restriction of the receptors diffusion to sub-micrometer sized domains. Furthermore, consistently with the long-term single-molecule data, the domains are found permeable.

© 2006 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: G-protein-coupled receptor; Lateral diffusion; Compartmentalization; Fluorescence recovery after photobleaching

1. Introduction

The signalling mechanism mediated by G-protein-coupled receptors proceeds through transient and sequential molecular interactions. The central step of the process takes place at the membrane and involves the interaction between the receptor, the heterotrimeric G-protein and the effector. By contrast to the long time prevailing collision-coupling model, the emerging view is that of a compartmentalization (even a pre-coupling) of the partners suggested to account for the rapidity and specificity of signalling [1]. To date, experimental analyses of the diffusion dedicated to the examination of the dynamic organization of the receptors are not abundant. However, data exist that have been obtained by ensemble average fluorescence based methods but also by single-molecule methods. Note that although less directly than single-molecule tracking techniques, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) allow both for the

characterization of domains when used at variable beam waist for FCS [2] or variable observation area radius for vrFRAP [3]. Interestingly, all existing studies performed, making use of one of these tools, revealed a confinement of the receptors within submicrometric domains. A vrFRAP analysis of the NK2 receptor diffusion showed that 30% of the receptors were restricted in compartments of about 300 nm size [4] at the surface of HEK cells. Single-molecule fluorescence tracking of NK1 and odorant receptors in the plasma membrane of HEK cells revealed a diffusion confined to domains of size ranging from 200 nm to 1 μ m [5,6]. The membrane dynamic of the human mu opioid (hMOP) receptor has been recently investigated in fibroblast cells using single particle tracking (SPT) at variable temporal resolutions [7,8]. Experiments pursued in different groups differed in the interpretation of the observed long term random diffusion but showed consistently a diffusion confined at short term. The associated domain size was found comprised between 200 and 700 nm depending on the acquisition rate and the presupposed geometry of the domains in the equation used to determine the domain size from the fit of the mean square displacement as a function of time [7–9]. Although necessary for their total validation, these observations have not yet been comforted by ensemble measurements.

The signalling process is far more complicated than described in the simplified scheme above and involves, in addition to the encounter of the receptor, the protein G and the effector, interactions with a number of cytosolic proteins which could influence the organization of the receptor [1,10,11]. Thus it can be anticipated that, in order to be fully relevant, the analysis of the functional membrane dynamics of G-protein-coupled receptor (GPCR) should be performed in native cells. The hMOP receptor, involved in pain phenomena, is predominantly found in the nervous central system [12]. We chose to explore the behavior of the receptor in neuronal cells. However, to date, due to the lack of high affinity specific antibodies, labelling of the native receptor for diffusion experiments cannot be envisaged. Thus, the SH-SY5Y neuroblastoma cell line, which expresses endogenously the hMOP receptor, was stably transfected by the cDNA construct encoding for the T7-EGFP-hMOP receptor. After having checked for the full functionality of the chimeric receptor, we performed vrFRAP measurements to analyse its diffusional behaviour at the surface of the neuroblastoma cells. Consistently with the previous single-molecule analysis on heterologous cells, we found the diffusion of the receptor to be restricted to domains.

*Corresponding author. Fax: +33 5 61 17 59 94.
E-mail address: laurence.salome@ipbs.fr (L. Salomé).

Abbreviations: hMOP, human mu opioid; GPCR, G-protein-coupled receptor; DAMGO, [D-Ala² N-Me-Phe⁴Gly-ol⁵]enkephalin; CTAP, D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂; DPN, diprenorphine; cAMP, cyclic adenosin monophosphate

2. Material and methods

2.1. Constructions

In construct A, double-stranded synthetic oligonucleotides encoding for the corresponding regions of the signal peptide of nicotinic-acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit (SP/ $\alpha 7$ AChR) followed by the T7 epitope (MASMTGGQQMG) was inserted into the *HindIII/SacI* site of bluescript SK+ plasmid (Stratagene). At the 3' end of T7 epitope gene, *SmaI-NheI-PstI-XbaI* restriction sites were introduced. In construct B, a recombinant EGFP lacking in ATG and stop codons was amplified from PEGFP-N1 (Clontech) by PCR using 5'-CACGTGGCTAGCGTGAGCAAGGGCGAGCTG-3' sense and 5'-CACGTGCTGCAGCTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3' antisense primers. These created the *PmlI*, *NheI* sites (underlined) at the 5' end of sense primer and *PmlI*, *PstI* sites (underlined) at the 5' end of antisense primer. The amplified fragment (0.7 Kb) digested by *PmlI* was inserted into *EcoRV* site of bluescript SK+ plasmid. In construct C, the ATG codons in the *HindIII* to *Eco47III* fragment of hMOP cDNA (cloned *HindIII-XbaI* in bluescript SK+) was suppressed by replacing this fragment by double-stranded synthetic oligonucleotides without ATG codons. At the 5' end of hMOP gene *PstI*, *SnaBI* restriction sites were introduced.

Finally, the modified EGFP fragment (construct B) was excised by a *NheI/PstI* digestion and introduced in construct A to give bluescript SK+ SP/ $\alpha 7$ AChR-T7-EGFP plasmid in which construct C (*PstI* to *XbaI* fragment of hMOP) was inserted into the *PstI/XbaI* sites. After control of the resulting construct SP/ $\alpha 7$ AChR-T7-EGFP-hMOP by restriction enzyme analysis and sequencing, it was subcloned in eucaryotic expression vector pRC/CMV (Invitrogen) at *HindIII/XbaI* restriction sites.

2.2. Cell culture and transfection

Cells were grown in DMEM supplemented with 10% foetal calf serum, glutamine, and antibiotic (0.05 mg/ml gentamicin) at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Cells (4 × 10⁶) were transfected with plasmid pRC/CMV-SP/ $\alpha 7$ AChR-T7-EGFP-hMOP (15 µg) using Lipofectamine 200 (Invitrogen) for SH-SY5Y neuroblastoma cells, or CaCl₂ for transiently transfected COS-M6 cells. Stable SH-SY5Y transfected cell line was obtained and maintained by addition of 0.4 mg/ml neomycin (G418, Gibco) in the culture medium.

2.3. Western blot analysis

Aliquots of 10 µg were analysed by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gel. After electrotransfer of the proteins to a nitrocellulose membrane [13], it was blocked in TBST, 5% non fat dried milk, 0.2% Tween 20 for 1 h and then immunostained with 1:5000 anti-T7 HRP antibody (Novagen) for 1 h at room temperature. Membrane was washed five times with TBST prior to detection with ECL method (Perkin Elmer).

2.4. Membranes preparation

Confluent cells were harvested by incubation at 37 °C for 20 min in PBS (1.5 mM EDTA). A cell pellet was prepared by centrifugation (200 × g, 10 min). After resuspension in TE (Tris 50 mM, 1 mM EDTA and pH 7.4) with protease inhibitor (Complete Mini, Roche), it was disrupted by nitrogen cavitation and centrifuged (1500 × g, 10 min). The supernatant was further centrifuged (100000 × g, 40 min) and the resulting membrane pellet resuspended in TE.

2.5. Binding assays

Experiments were performed on membrane aliquots (20–200 µg) as described previously [14] using radiolabelled ligands [³H]DAMGO or [³H]DPN (0.1–4 nM) for saturation assays, and morphine or D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH₂(CTAP) (4 nM–0.2 µM) for competition against [³H]DPN (1 nM). Bound radioactivity was measured in a Liquid Scintillation Analyser (Tri-Card 2100TR, Packard). Dissociation constant (K_d) and receptor densities (B_{max}) were calculated by Scatchard's analyses [15]. Inhibition constants (K_i) were calculated from inhibition assays of [³H]DPN binding. Data were analysed using Prism software (GraphPad Software).

2.6. cAMP accumulation assays

Cyclic adenosin monophosphate (cAMP) level was determined after cell stimulation by 10 µM forskolin in the presence or not of [D-Ala² N-Me-Phe⁴ Gly-ol⁵]enkephalin (DAMGO) or morphine at concentrations ranging from 1 to 10⁻⁵ µM as described by Capeyrou et al. [16].

2.7. Membrane protein, lipid and cholesterol content measurements

Membrane protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. [17] using bovine serum albumin as standard. Lipid extracts were prepared following the Bligh–Dyer method [18]. Cholesterol content was measured using the method of Zlatkis [19]. Phospholipids were quantified using a phosphorus assay [20].

2.8. FRAP measurements

Two days before the experiment, cells were plated on coverslips. After a careful rinsing of the cells with PBS, coverslips were placed in a home made stage and constituted one of the faces of a microscope chamber of 30 µm depth. FRAP measurements were performed at 20 ± 1 °C (additional experiments were made at 37 °C) in uniform disk illumination conditions using an epifluorescence microscope based device. The radius of the observation area was varied between 1.4 and 3.45 µm, the bleaching time was set between 20 and 50 ms and recoveries were followed during 30 s. Three independent campaigns of experiments were performed proceeding each to the acquisition of 30 fluorescence recoveries for each observation radius on different cells. The resulting fluorescence recovery curves of one campaign measurements are cumulated for each radius and then fitted using the expected theoretical equation for a single population to determine the corresponding apparent diffusion coefficient and mobile fraction [21].

3. Results and discussion

3.1. Pharmacological characterisation of T7-GFP-hMOP receptor in SH-SY5Y

In addition to the EGFP required for FRAP measurements and a T7 tag allowing for recognition by high affinity specific antibodies, the cleavable signal peptide of the nicotinic $\alpha 7$ AChR was also fused at the N terminus of hMOP receptor to address properly the chimeric receptor at the cell surface (Fig. 1, [22]). To avoid bias or perturbations to the membrane organization that could originate from transient transfections, a SH-SY5Y stable cell line expressing T7-EGFP-hMOP receptor was established and fully characterized.

3.1.1. Transfection and membrane expression. To guarantee an homogeneous level of expression of the receptor among the cells after transfection, a monoclonal cell line was selected. This was confirmed with a unimodal distribution showed by flux cytometry analysis (data not shown). The membrane expression of the transfected receptor was checked by fluorescence confocal microscopy. Cells exhibited homogeneously fluorescent plasma membranes and no aggregates were visible in the cytoplasm (Fig. 3A). Furthermore, Western blot analysis using an anti-T7 antibody showed a single band at the molecular weight of glycosylated receptor suggesting that no truncated forms of the fusion protein were generated upon targeting to the plasma membrane (Fig. 2).

3.1.2. Binding and adenylyl cyclase inhibition. Binding of agonist and antagonist ligands to cell membranes was measured either directly using radiolabelled ligands or by competi-

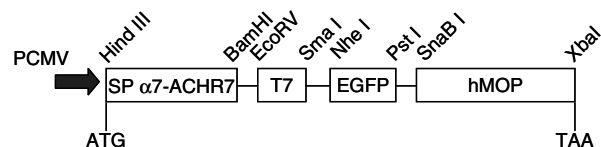


Fig. 1. Schematic representation of the pRC/CMV/SP-T7-EGFP-hMOP vector used in this work. SP: Signal peptide of the nicotinic-acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit; T7: T7-Tag; EGFP: Enhanced green fluorescent protein; hMOP: human mu opioid.

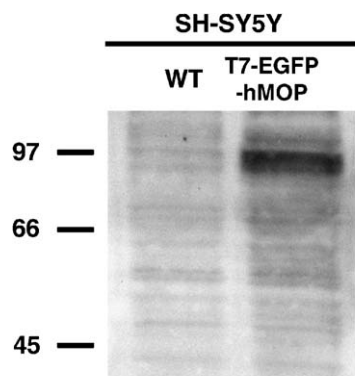


Fig. 2. Western blot analysis of WT SH-SY5Y cells and SH-SY5Y expressing T7-EGFP-hMOP. Using monoclonal anti-T7 HRP antibody, a band is revealed at the expected molecular weight (93 kDa) in transfected cells, whereas no band is found in wild type cells.

tion with an unlabelled ligand diprenorphine (DPN) both on wild-type and transfected SH-SY5Y cells.

Within the concentration range explored, specific binding of [3 H]DPN and [3 H]DAMGO were saturable. DPN binding measurements revealed a T7-EGFP-hMOP density (B_{\max}) of 2.9 pmol/mg of protein in the transfected SH-SY5Y membrane, ten fold larger than that of the endogenous receptor in WT SH-SY5Y cells. The measured K_d for DPN and DAMGO and K_i for CTAP and morphine in transfected cells are in agreement with those obtained for the endogenous hMOP receptor in WT SH-SY5Y cells (Table 1 and [23]) and for the same construct transiently expressed in COS-M6 cells lacking in the endogenous hMOP receptor (Table 1).

The chimeric receptor functionality was further investigated by evaluating the decrease of cellular cAMP level following activation by an agonist after stimulation of the adenylyl

cyclase by forskolin. Both DAMGO and morphine inhibited cAMP production in a concentration-dependent manner. In transfected SH-SY5Y, a maximum decrease of 95% of cAMP level was observed while, in concordance with literature data [23], it was limited to 30% in WT cells presumably due to the low expression level of the endogenous receptor. The EC_{50} in transfected cells were found to be equal to 0.40 nM for DAMGO and of 2.2 nM for morphine comparable to the values obtained in WT cells (data not shown).

3.1.3. Receptor internalization. As a further investigation of cellular response consecutive to ligand binding we qualitatively examined the localisation of the T7-EGFP-hMOP receptor after exposure to saturating concentrations of antagonist and agonist. The latter generally induces the internalization of GPCRs [1,24].

Fluorescence images of the cells captured after 30 min incubation with 1 μ M ligand solutions at room temperature are shown in Fig. 3. After exposure to an antagonist, CTAP or DPN, cells exhibited a fluorescence restricted to the plasma membrane (Fig. 3B) with no detectable change from the basal state (Fig. 3A). On the contrary, the peptide agonist DAMGO induced T7-EGFP-hMOP receptor internalization detected as the strong decrease of the labelling of the plasma membrane together with the presence of numerous fluorescent intracellular vesicles (Fig. 3C). As expected, receptor internalization was accelerated at 37 $^{\circ}$ C for DAMGO and took place within only five minutes, a kinetics similar to that observed for endogenous wild-type receptors in neurons [25]. Morphine led also to internalization of the receptor but much less rapidly, consistently with previous reports [26] (data not shown).

3.1.4. Membrane composition. The determined relative protein, cholesterol, lipid proportions and lipidic composition of cell membranes were found comparable for WT and transfected SH-SY5Y showing a probable absence of effect of the transfection on the membrane environment of the receptor.

Table 1
Pharmacological properties of endogenous hMOP in SH-SY5Y WT and T7-EGFP-hMOP in SH-SY5Y and COS-M6 cells

Ligands	Pharmacological parameters	hMOP SH-SY5Y	T7-EGFP-hMOP SH-SY5Y	T7-EGFP-hMOP COS-M6
DAMGO	K_d (nM)	2.69 ± 1.67	1.60 ± 0.21	1.30 ± 0.60
	B_{\max} (pmol/mg prot)	0.02 ± 0.01	0.94 ± 0.14	nd
DPN	K_d (nM)	0.73 ± 0.14	0.33 ± 0.10	0.34 ± 0.16
	B_{\max} (pmol/mg prot)	0.23 ± 0.02	2.90 ± 0.23	nd
Morphine	K_i (nM)	nd	27 ± 13	18 ± 2
CTAP	K_i (nM)	nd	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.2

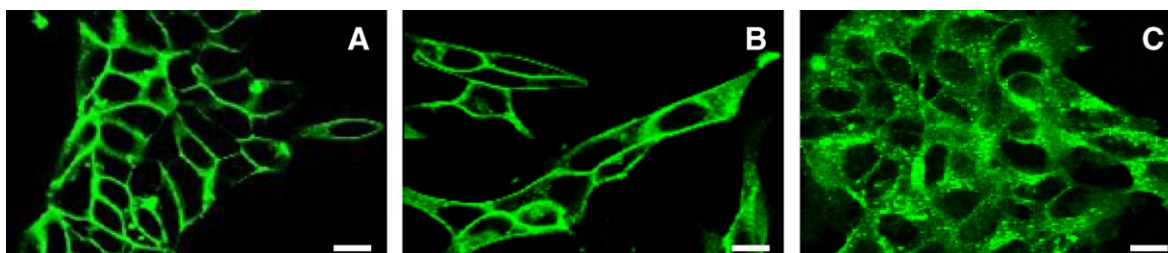


Fig. 3. Confocal images showing the localisation of T7-EGFP-hMOP in transfected SH-SY5Y cell line at room temperature, in absence or in presence of ligands. Plasma membrane localisation of fluorescent receptors without activation is shown in panel (A). Incubation with an antagonist (CTAP, 1 μ M, 30 min) does not change the fluorescence pattern (B) whereas incubation with an agonist (DAMGO, 1 μ M, 30 min) induced receptor internalisation (C). Scale bar is 20 μ m.

As found previously [27], the major fatty acids were C18:0, C16:0 and unsaturated C18, phosphatidylcholine (PC) was the main polar head ($40 \pm 4\%$) while sphingomyelin (SM), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI) and phosphatidylserine (PS) were found in similar proportions ($12\text{--}15\%$). Cholesterol content represented $31 \pm 4\%$ mol/mol of the phospholipids and the phospholipid to protein ratio was found equal to $232 \pm 45 \mu\text{mol/g}$.

In conclusion, we showed that T7-EGFP-hMOP receptor stably expressed in SH-SY5Y cells is properly targeted at the plasma membrane. Moreover, this chimeric receptor exhibits full ligand binding and adenylyl cyclase inhibition capacities as compared to the endogenous receptor. The further dynamic analysis of T7-EGFP-hMOP receptor in transfected SH-SY5Y cells will thus report an accurate perception of the native receptor behaviour in its natural environment.

3.2. Variable radius FRAP measurements

FRAP experiments carried out at variable radius of the illuminated area (vrFRAP) allow when domains exist to identify their presence and determine their size r by the relation expected between the mobile fraction M , the observation radius R and r :

$$M = 0.63r/R + M_p \quad (1)$$

where the constant mobile fraction M_p can originate from free diffusion apart from disconnected domains or from apertures in the frontiers of juxtaposed domains. In the simple case of a membrane organized in connected (or juxtaposed but disconnected) domains, the diffusion coefficient D_o inside the domains can be derived from the measured apparent one D_m using the equation [3].

$$D_o = 1/2D_m(r/R)^2 \quad (2)$$

Prior to go through this thorough analysis of the data, we first checked for the eventual existence of two populations. The computed recovery curves were systematically not better described by the cumulative contribution of two populations with different diffusion coefficients (Fig. 4). The three independent campaigns of experiments performed at various R led to three sets of coupled parameters: $M = f(R)$ and $D_m = f(R)$.

On M versus $1/R$ plots, all data points are found distributed on a straight line of positive slope intercepting the y axis at a non zero value (Fig. 5). This is in favor of a compartmentalization of the receptors, at least partial or within partially leaking domains. From the linear regression of the plot, we deduced a domain radius equal to $700 \pm 100 \text{ nm}$ and a permanent mobile fraction M_p of $55 \pm 5\%$. According to Salomé et al. [3], drastic effects on the contribution to long distance diffusion is expected for moderate leaking of the domains. Such a value of M_p can be accounted for by a 7% aperture of the perimeter of the domains. The measured diffusion coefficients D_m tended to increase with the observation radius R . The values of the measured diffusion coefficients comprised between 0.8 and $1.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ are abnormally large consistently with the fact that confined diffusion lead to apparent biased values of the diffusion coefficient. Using Eq. (2), the recalculated diffusion coefficient D_o was found constant and close to $3 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ as it can be expected for a protein diffusion coefficient in the plasma membrane [7,28] (Fig. 5). Recovering a value of D_o , lower than any measured D_m , independent of R ,

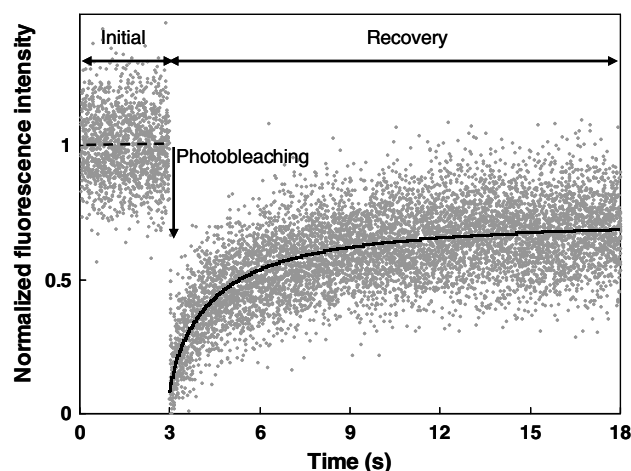


Fig. 4. FRAP experiment: normalized fluorescence intensity as a function of time. The recovery data (grey dots) is fitted (black curve) by the expected theoretical equation for a single population (see text). Here the observation area radius is equal to $2.95 \mu\text{m}$, the fit leads to $M = 74 \pm 1\%$ and $D_m = 1.8 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

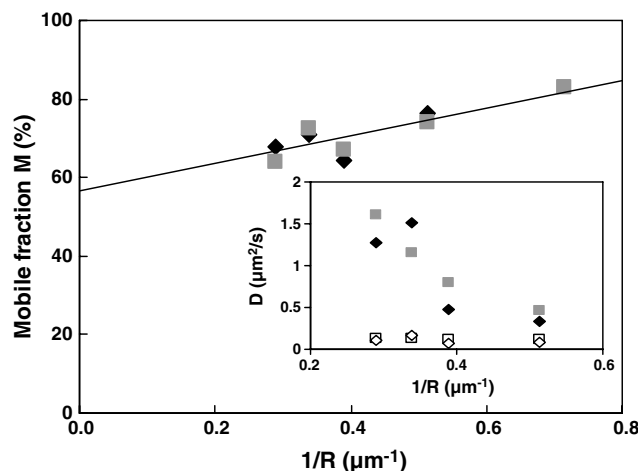


Fig. 5. Plot of the mobile fraction M versus the inverse of the radius of the observed area obtained in one set of FRAP experiments. Measurements were performed at 20°C (black diamonds) and 37°C (grey squares). The slope of the linear fit gives the domain radius (see text). Insert shows the corresponding variations of D_m (filled symbols) and D_o (calculated from D_m according to Eq. (2), open symbols) versus the opposite of the radius of the observed area. Each symbol represents a set of about 30 experiments, carried out during the same campaign of measurement, error bars (95% confidence level) are within symbols.

strongly suggests that the ensemble of the receptors are distributed within domains where they diffuse with D_o with an escape probability to a neighbouring domain leading to long range diffusion. As shown in Fig. 5, experiments performed at 37°C led to results identical to those obtained at 20°C : the domain size and diffusion coefficient inside the domains are unchanged. As a raise in temperature is expected to increase the membrane fluidity [29], this might reflect the occurrence of additional interactions which slow down the diffusion while maintaining the underlying dynamic organization of the receptors.

Such a dynamic organization of the receptor is in contrast to the one evidenced by vrFRAP for the NK2 receptors that were found to be only partially confined in sub-micrometer closed

domains (35%) while the majority exhibited a long-range free diffusion (65%) [4]. On the other hand, the permanent short-term confinement evidenced by vrFRAP is quite consistent with the hMOP receptor single particle tracking existing data. The diffusion coefficients differ by a factor of 4 accordingly to the difference found between measurements performed by FRAP and SPT on lipidic bilayers [30]. However, domain sizes found by vrFRAP on the neuroblastoma cells tend to be significantly larger than those by SPT on fibroblasts but this would need further investigation to settle whether it originates from the differences in the cell lines or in the techniques. More importantly, our results raise the question of the underlying mechanism for the passage between domains. It could be due, depending on the confinement origin, either to the escape from a trapping potential to a neighboring one or to a permeability of rigid fences delineating the domains [31]. Now, further experiments are needed on ligand bounded receptors to address this issue and give insights into the functional role for this dynamic confinement of the receptors.

Acknowledgements: This work and G.G. was supported by CNRS and MENESR joint DRAB program. A.S. is the recipient of a postgraduate fellowship from MENESR.

References

- [1] Hur, E.M. and Kim, K.T. (2002) G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* 14, 397–405.
- [2] Wawrezynieck, L., Rigneault, H., Marguet, D. and Lenne, P.F. (2005) Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys. J.* 89, 4029–4042.
- [3] Salome, L., Cazeils, J.L., Lopez, A. and Tocanne, J.F. (1998) Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. *Eur. Biophys. J.* 27, 391–402.
- [4] Cezanne, L., Lecat, S., Lagane, B., Millot, C., Vollmer, J.Y., Matthes, H., Galzi, J.L. and Lopez, A. (2004) Dynamic confinement of NK2 receptors in the plasma membrane. Improved FRAP analysis and biological relevance. *J. Biol. Chem.* 279, 45057–45067.
- [5] Lill, Y., Martinez, K.L., Lill, M.A., Meyer, B.H., Vogel, H. and Hecht, B. (2005) Kinetics of the initial steps of g protein-coupled receptor-mediated cellular signaling revealed by single-molecule imaging. *Chem. phys. chem.* 6, 1633–1640.
- [6] Jacquier, V. (2005) Functional Characterization of a human Odorant Receptor. PhD Thesis, Ecole Polytechnique de Lausanne, Switzerland.
- [7] Daumas, F., Destainville, N., Millot, C., Lopez, A., Dean, D. and Salome, L. (2003) Confined diffusion without fences of a G-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophys. J.* 84, 356–366.
- [8] Suzuki, K., Ritchie, K., Kajikawa, E., Fujiwara, T. and Kusumi, A. (2005) Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophys. J.* 88, 3659–3680.
- [9] Meilhac, N., Le Guyader, L., Salomé, L. and Destainville, N. (2006) Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys. Rev. E* 73.
- [10] Becamel, C., Gavarini, S., Chanrion, B., Alonso, G., Galeotti, N., Dumuis, A., Bockaert, J. and Marin, P. (2004) The serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors interact with specific sets of PDZ proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 20257–20266.
- [11] Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A. and Fagni, L. (2003) The ‘magic tail’ of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* 546, 65–72.
- [12] Mansour, A., Schafer, M.K.H., Newman, S.W. and Watson, S.J. (1991) Central distribution of opioid receptors: a cross-species comparison of the multiple opioid system of the basal ganglia. In *neurobiology of opioids*, 169.
- [13] Bers, G. and Garfin, D. (1985) Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection. *Biotechniques* 3, 276–288.
- [14] Gaibelet, G., Capeyrou, R., Dietrich, G. and Emorine, L.J. (1997) Identification in the mu-opioid receptor of cysteine residues responsible for inactivation of ligand binding by thiol alkylating and reducing agents. *FEBS Lett.* 408, 135–140.
- [15] Scatchard, G. (1949) *NY Acad. Sci.* 51, 660–672.
- [16] Capeyrou, R., Riond, J., Corbani, M., Lepage, J.F., Bertin, B. and Emorine, L.J. (1997) Agonist-induced signaling and trafficking of the mu-opioid receptor: role of serine and threonine residues in the third cytoplasmic loop and C-terminal domain. *FEBS Lett.* 415, 200–205.
- [17] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- [18] Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- [19] Zlatkis, A., Zak, B. and Boyle, A.J. (1953) A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J. Lab. Clin. Med.* 41, 486–492.
- [20] Rouser, G., Fkeischer, S. and Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 5, 494–496.
- [21] Lopez, A., Dupou, L., Altibelli, A., Trotard, J. and Tocanne, J.F. (1988) Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments under conditions of uniform disk illumination. Critical comparison of analytical solutions, and a new mathematical method for calculation of diffusion coefficient D. *Biophys. J.* 53, 963–970.
- [22] Peng, X., Katz, M., Gerzanich, V., Anand, R. and Lindstrom, J. (1994) Human alpha 7 acetylcholine receptor: cloning of the alpha 7 subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional alpha 7 homomers expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 45, 546–554.
- [23] Kazmi, S.M. and Mishra, R.K. (1987) Comparative pharmacological properties and functional coupling of mu and delta opioid receptor sites in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Pharmacol.* 32, 109–118.
- [24] von Zastrow, M., Svingos, A., Haberstock-Debic, H. and Evans, C. (2003) Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 348–353.
- [25] Minnis, J.G., Patierno, S., Kohlmeier, S.E., Brecha, N.C., Tonini, M. and Sternini, C. (2003) Ligand-induced mu opioid receptor endocytosis and recycling in enteric neurons. *Neuroscience* 119, 33–42.
- [26] Horner, K.A. and Zadina, J.E. (2004) Internalization and down-regulation of mu opioid receptors by endomorphins and morphine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 1028, 121–132.
- [27] Reynolds, L.M., Dalton, C.F. and Reynolds, G.P. (2001) Phospholipid fatty acids and neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* 309, 193–196.
- [28] Pucadyil, T.J., Kalipatnapu, S., Harikumar, K.G., Rangaraj, N., Karnik, S.S. and Chattopadhyay, A. (2004) G-protein-dependent cell surface dynamics of the human serotonin_{1A} receptor tagged to yellow fluorescent protein. *Biochemistry* 43, 15852–15862.
- [29] Derzko, Z. and Jacobson, K. (1980) Comparative lateral diffusion of fluorescent lipid analogues in phospholipid multibilayers. *Biochemistry* 19, 6050–6057.
- [30] Lee, G.M., Ishihara, A. and Jacobson, K.A. (1991) Direct observation of brownian motion of lipids in a membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6274–6278.
- [31] Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A. (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J. Cell. Biol.* 157, 1071–1081.

Functional membrane diffusion of G-protein coupled receptors

Aurélie Baker · Aude Saulière · Fabrice Dumas ·
Claire Millot · Serge Mazères · André Lopez ·
Laurence Salomé

Received: 16 February 2007 / Revised: 31 July 2007 / Accepted: 3 August 2007
© EBSA 2007

Abstract G-protein-coupled receptor function involves interactions between the receptor, G-proteins and effectors in the cell plasma membrane. The main biochemical processes have been individually identified but the mechanisms governing the successive protein–protein interactions of this complex multi-molecular machinery have yet to be established. We discuss advances in understanding the functional dynamics of the receptor resulting from diffusion measurements, and in the context of the plasma membrane organization.

Keywords Signal transduction · Protein interactions · Membrane domain · Cytoskeleton · FRAP · SPT

Abbreviations

GPCR G-protein-coupled receptor
FRAP Fluorescence recovery after photobleaching
vrFRAP Variable radius FRAP
SPT Single particle tracking
SMT Single molecule tracking
FCS Fluorescence correlation spectroscopy

Aurélie Baker and Aude Saulière contributed equally to this work.

Presented at the joint biannual meeting of the SFB-GEIMM-GRIP, Anglet France, 14–19 October, 2006.

A. Baker · A. Saulière · F. Dumas · C. Millot · S. Mazères ·
A. Lopez · L. Salomé (✉)
Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale,
UMR CNRS-Université Paul Sabatier 5089,
205, route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex 09, France
e-mail: laurence.salome@ipbs.fr

Introduction

G-protein-coupled receptors (GPCRs) represent the largest receptor family involved in the communication of a cell with its external environment (Bockaert and Pin 1999). This signal transduction across cell membranes is initiated by the activation of GPCRs on binding extracellular agonist ligands (Fig. 1). Agonist binding is followed by a cascade of transient and successive molecular interactions in the cytoplasm leaflet of the cell plasma membrane (Kristiansen 2004). The process is started by the recruitment and the activation of the heterotrimeric G-proteins, stimulating GDP-GTP exchange (Gilman 1987) and inducing the activation of GTP-bound G_α -subunit and $G_{\beta\gamma}$ -dimer. (Fig. 1) (Bockaert and Pin 1999; Gales et al. 2006; Kenakin 2002; Rebois et al. 2006). All GPCRs couple to at least two classes of G_α proteins, which, like the $G_{\beta\gamma}$ -dimer proteins, induce distinct biological functions after activating their specific secondary effectors (Gilman 1987) (Fig. 1). This process is amplified through repetitive coupling between various G-proteins and the ligand-bound GPCR (Neubig 1994), and also between the activated G-protein subunits and their effectors. These sequential encounters suggest that the heterotrimeric G-protein complex dissociates after it is activated for signalling (Digby et al. 2006); however, results obtained for several GPCR instead indicate that the complex remains stable throughout (Gales et al. 2005). Data also suggest the existence of receptor-G-protein-effector complexes during transduction (Hur and Kim 2002). In any case, the membrane mobility of the activated receptor on the cell surface together with that of the G-proteins and the effectors constitute the main determinant in their encounters.

A GPCR deactivation process involving two main mechanisms occurs in parallel with signal transduction:

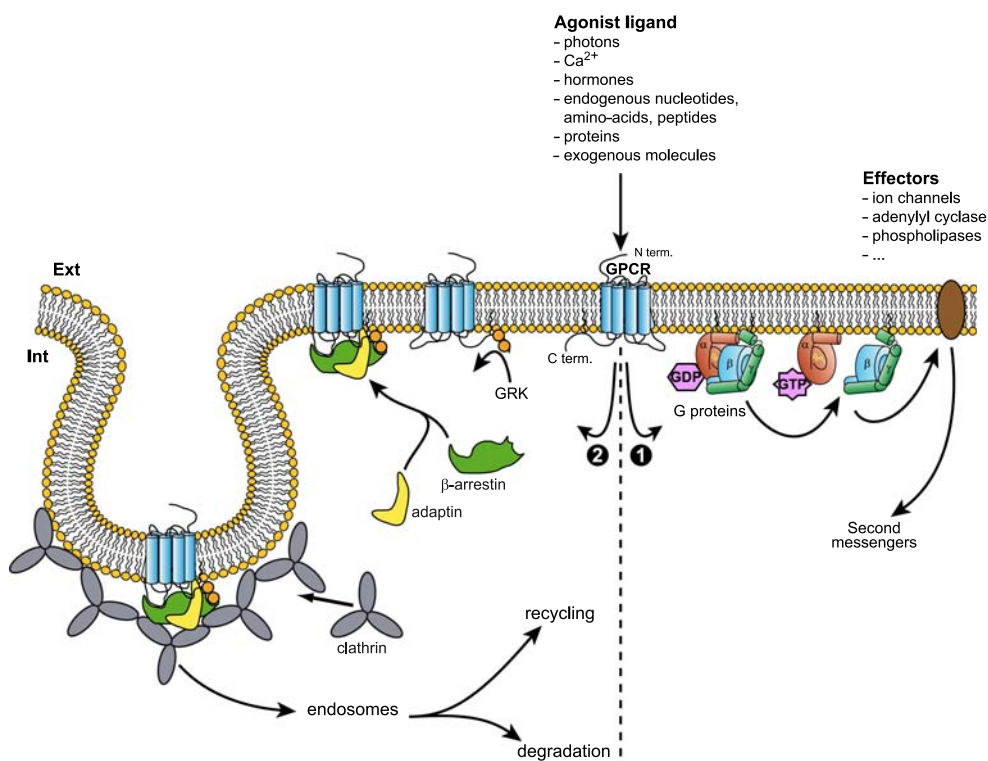


Fig. 1 Main events consecutive to an agonist binding by a GPCR: signal transduction (1) and receptor internalisation (2). 1 Stimulated receptor interacts with the GDP-bound heterotrimeric G protein, promoting a GDP-GTP exchange. The activated $G\alpha$ and $G\beta\gamma$ subunits are then able to interact with effectors inducing the cellular responses. 2 A

phosphorylation at GPCR C terminus is accomplished by G-protein receptor kinase (GRK) followed by the β -arrestin binding and subsequently adaptin leading to the formation of clathrin-coated pits further internalised

(1) unbinding of the agonist and (2) endocytosis of the receptor, followed by either its recycling or degradation (Fig. 1). Endocytosis of the receptor follows GPCR phosphorylation, induced by G-protein receptor kinase (GRKs) after agonist binding. β -arrestin subsequently forms a complex with the phosphorylated GPCR and adaptins, and this complex is targeted and collected to clathrin coated pits (Carman et al. 1998).

The main biochemical processes have been individually identified, but the molecular structures, the dynamics of each partner, and the successive protein-protein interactions that govern these multi-molecular events remain to be established. Random collision-coupling, the prevailing long-standing model for these interactions, was proposed by Levitzki et al. on the basis of kinetic analysis of the coupling between β -adrenergic receptors and adenylyl cyclase effectors; this model suggests that lateral mobility of the signalling partners controls the sequential interaction process (Tolkovsky and Levitzki 1978). This model accounts well for transducine activation being dependent on light-activated rhodopsin diffusion rates (Calvert et al. 2001). However, it fails to explain the specificity and rapidity of the signalling pathway, as shown by biochemical and phar-

macological studies. More recent models propose a compartmentalisation of the signalling partners favouring their encounters (Chidiac 1998; Hur and Kim 2002; Neubig 1994). A concept has been developed involving particular membrane platforms: transducisomes, a term describing all protein machineries requisite for a given biological function (Burack and Shaw 2000; Tsunoda et al. 1997). This view is corroborated by recent advances in understanding the dynamic organisation of neuronal synapses (Choquet and Triller 2003). This question must be considered in the context of the lateral organisation of the plasma membrane. The plasma membrane is characterised by complex dynamic heterogeneous distributions of lipids and proteins, which are believed to have functional implications (Engelman 2005; Marguet et al. 2006).

A full understanding of GPCR signal transduction mechanisms requires a refined description of the dynamic organisation of the signalling partners, which can be achieved by investigating their membrane diffusion. In this mini-review, we discuss advances in the understanding of receptor diffusion behaviour, which have been permitted by the recent progress made in molecular biology and biophysics instrumentation.

Techniques for membrane diffusion measurements

Current methods to measure the lateral mobility of proteins (or lipids) in the plasma membrane use optical microscopy, and most often fluorescence. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) provide average measurements, whereas single molecule or particle tracking (SMT or SPT) acquires the trajectories of single molecules (Table 1). The literature is already rich in reviews dealing with these techniques (Chen et al. 2006). Therefore, we will restrict ourselves to an overview of their respective ability to distinguish several populations and characterise confined diffusion.

First, let us examine two important steps preceding any diffusion measurements: the strategy for the necessary labelling of the receptor and the choice of the expression cell line. The choice of the label depends on the envisaged technique. FCS and SMT require particularly photostable fluorophores, whereas FRAP takes advantage of fluorescence fading. SPT makes use of functionalised nanoparticles, which can be fluorescent or not. Using fluorescent ligands limits the analysis to monitoring receptors in a bound state, and antibodies directed against the native receptors are not always available or of sufficiently high specificity and affinity. Thus, the study of tagged receptors has been favoured ever since the start of molecular biological engineering. The most exploited constructs consist of a direct fusion with the receptor of intrinsically fluorescent proteins, such as the green fluorescent protein (GFP) and its mutant variants (Kallal and Benovic 2000; White and Stelzer 1999). Alternative routes, which allow for the labelling of proteins at the cell surface, are fusions with small tags (T7, Myc or His tags); these are recognized by antibodies bearing the probe or with new tags (based on proteins covalently labelled with chemically diverse compounds (George et al. 2004; Tirat et al. 2006).

Besides classical limitations, such as the adherence and the ability to grow on glass coverslips, which are common to all optical microscopy-based techniques, the possibility of transfection and expression at the plasma membrane for the study of G-protein coupled receptors imposes additional requirements in the choice of the cell line. There are multiple protein partners involved in the signalling process of the membrane. Therefore in terms of biological relevance, it seems quite reasonable that the dynamic behaviour of a given G-protein coupled receptor should be investigated in the environment in which it is naturally expressed: neuronal cells for neurotransmitter and opioid receptors (Choquet and Triller 2003; Sauliere et al. 2006), and immune cells for chemokine receptors, and so on. The expression levels and the pharmacological properties of the tagged transfected receptor are also important. Ideally, these conditions should be as similar to those of the untagged receptor. Monoclonal stable transfected cell lines, in contrast to transient transfections, offer a cell-to-cell quasi-invariant number of receptors and constant pharmacological properties, but cannot be envisaged for all cells (neurons, for example). Conserving pharmacological properties of the wild-type receptor may restrict the choice of large tags, such as GFP-fused proteins. Large tags introduced at the C terminus can hamper the interaction of the receptor with cytosolic protein partners. However, large N-terminal tags may obstruct the ligand binding site on the receptor or may cause receptor misfolding in the plasma membrane. All conditions can rarely be brought together, and thus most studies result from experiments carried out in eukaryote heterologous expression systems and/or on transiently transfected cells.

Fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP)

Fluorescence recovery after photobleaching has been the most extensively used approach for diffusion analysis in

Table 1 Qualitative comparisons of the different light microscopy-based techniques for single cell measurements of the lateral diffusion of membrane lipids and proteins

Technique	Spatial (δx) and temporal (δt) resolutions	Advantages	Disadvantages
Fluorescence recovery after photobleaching	$\delta x \sim 200$ nm $\delta t \sim 1$ ms	Rapid acquisition of an average measurement	Dependence of D and M with observation radius (FRAP) or beam waist (FCS) Modelisation is required for interpreting the data
Fluorescence correlation spectroscopy	$\delta x \sim 200$ nm (using nano-apertures can lower this limit) $\delta t \sim 50$ μ s	Identification and characterization of domains by variable radius or waist	Modelisation is required for interpreting the data
Single particle tracking	$\delta x \sim 1$ –10 nm $\delta t \sim 25$ μ s–40 ms	Detailed information on the displacement modes and direct determination of the distribution between sub-populations of the tracked molecules	Size of the particle Possible selectivity of the labeling of the tracked molecules
Single molecule tracking	$\delta x \sim 10$ –40 nm $\delta t \sim$ a few ms		Short duration of the trajectories Possible cell damage due to the illumination

membranes, since its emergence 30 years ago. In a FRAP experiment, the intensity of fluorescence is monitored in a defined zone after photo-bleaching fluorophores with a short pulse. The analysis of the fluorescence recovery curve, due to the diffusion of the unbleached molecules from outside of this zone, leads to the determination of the diffusion coefficient and the fraction of mobile molecules. However, the simplicity of this principle masks major concerns in interpreting observations or comparing data from various labs. Indeed, for molecules not homogeneously distributed, which is true for most complex molecular assemblies such as membranes, the measured diffusion coefficient is an apparent value and is dependent on the geometry of the bleached zone.

Interestingly, FRAP has given rise to a powerful approach that allows the identification and characterization of domains: FRAP at variable spot radius (vrFRAP). We expect a decrease in the mobile fraction, as a function of the observation area, in the range of observation radii (R) larger than the domain size (L). For a compartmentalised membrane organised with domains that are side by side, the mobile fraction has been shown to increase linearly with $1/R$, as $M = M_p + 0.63 L/R$, where $M_p = 0$ for closed domains and has positive values for permeable domains. The slope of $M = f(1/R)$ allows the calculation of L . In addition, the real diffusion coefficient inside the domains can then be calculated from the apparent measured diffusion coefficient (Salome et al. 1998). If the domains are not joined, an additional contribution to the mobile fraction extrapolated at infinite R (or large scale) can arise. In this case, the population of molecules which diffuses over a long distance would therefore experience various environments. This population would have a distinct diffusion coefficient, and any analysis should consider the contribution of two populations with two diffusion coefficients. Such an approach has been successfully applied in the study of the NK2 and CCR5 receptor (Baker et al. 2007; Cezanne et al. 2004). It is important to note that, these experiments need the development of dedicated devices to be performed rigorously. The equipment implemented in our laboratory has a range of observation radii between 1 and 5 μm , giving access to domain sizes as small as 150 nm (Salome et al. 1998).

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)

Fluorescence correlation spectroscopy developed simultaneously with FRAP; however, this method has yet to be widely exploited for membrane diffusion measurements. Recent developments have seen it used similarly to vrFRAP, and the possibility of varying the observation volume size makes it a promising tool (Wawrezynieck et al. 2005). FCS analyses the fluctuations of the fluorescence

intensity produced by a small number of molecules. These molecules diffuse in and out of an observation volume defined by a focused laser. The diffusion coefficient (D) of the molecule is deduced from the autocorrelation function of the fluorescence signal. The variation of D with w , the waist of the focused laser beam, allows the user to discriminate between isolated and joint domains of sizes down to 30 nm when measurements are performed across metallic nano-apertures (Wenger et al. 2006).

Single particle or molecule tracking (SPT or SMT)

Single particle or molecule tracking techniques use video-microscopy coupled to image analysis to monitor the movements of individual molecules with nanometric spatial resolution (Bates et al. 2006; Sako and Yanagida 2003). The probes used are either single fluorescent molecules or more frequently nanometre-sized particles (latex beads, nanocrystals or gold colloids), which compensate for the disadvantage of large size by a capacity for longer periods of imaging. The particle is attached to the membrane molecule through antibodies, which have been adsorbed onto the particle surface. Ideally, the number of antibody molecules should be one per particle to minimize potential multiple attachment of targeted molecules to the particle (Daumas et al. 2002). Fab fragments should be favoured but they cannot be used systematically due to a low affinity constant. Also, particular care is needed to check for labelling specificity, which should not be lower than 80%. The spatial resolution of the trajectories ranges between 10 and 40 nm, whereas the image acquisition time can be decreased down to the millisecond range [exceptionally, data have been published at a rate of 25 $\mu\text{s}/\text{frame}$ (Fujiwara et al. 2002)]. Trajectory analysis aims at determining the type of movement or diffusion mode of the tracked molecule and its characteristic parameters (e.g. diffusion coefficients, domain size, velocity). This analysis involves a simple calculation of the mean square displacement for increasing time intervals, whose analytical expression is known for elementary diffusion modes and can be used to distinguish efficiently between random diffusion, directed diffusion combining a directed motion to a pure diffusion, and confined diffusion (see Fig. 2). There are inherent fluctuations that characterise the trajectories; therefore, more complex behaviour, such as transient confinement or other combinations of simple modes, require a thorough statistical analysis for extracting the contained invaluable information. Recently, powerful new algorithms have been developed for detecting various forms of transient behaviour: confinement and jumps between adjacent domains (Meilhac et al. 2006; Destainville and Salome 2006), directed motion (Bouzigués and Dahan 2007) and multi-type motion (Huet et al. 2006).

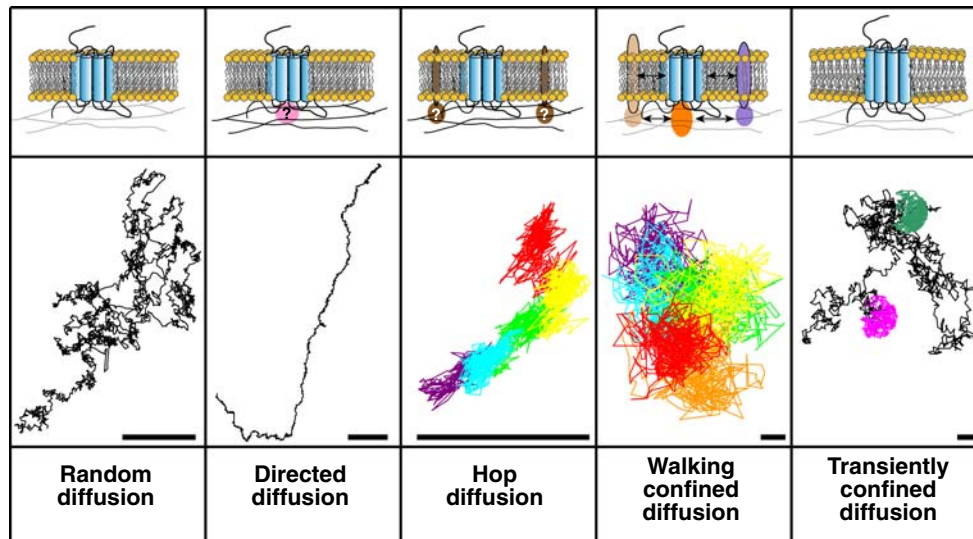


Fig. 2 Various putative GPCR membrane dynamic organisations: models and associated trajectories. Random diffusion: in the absence of interactions a free Brownian motion is expected. Directed diffusion: a protein link with cytoskeleton filaments drives a directional motion. Hop diffusion: in the “Anchored protein-Pickets and Skeleton Fences model” (Fujiwara et al. 2002) the diffusion proceeds by jumps across the barriers delineating the juxtaposed domains. Walking confined diffusion: a Brownian model of protein–protein attractive interactions

predicts a rapid confined diffusion into domains with slower diffusion (Daumas et al. 2003) Transiently confined diffusion: an affinity with lipid micro-domains is supposed to correlate with transient confinement zones (Dietrich et al. 2002). Except transient confinement trajectory which is a simulated one, all trajectories represented come from MOP tracking (Daumas et al. 2003) (Saulière, unpublished data). Scale bar 200 nm

Diffusion behaviour of free GPCRs

Recently, there has been a significant increase in the number of studies relating to membrane diffusion of G-protein coupled receptors. These studies offer a wealth of data on various receptors and cellular expression systems (Table 2). Most of the studies, that use conventional FRAP, report systematically long-range diffusion properties for a large mobile fraction of the receptors, in addition to an immobile fraction. However, these studies do not provide detailed information relating to dynamic membrane organisation of the receptors. To date, few data are available by FCS at constant waist. However, the studies by vrFRAP and SPT are more informative, revealing two prevailing types of movement.

In general, the vrFRAP and SPT approaches showed a confinement, or partial confinement, in receptor diffusion. Our analysis of NK2, hMOP and CCR5 receptor diffusion using vrFRAP, supported a total or partial compartmentalization of the receptors in domains of sizes ranging from 400 nm to 1.5 μm . The NK2 (Cezanne et al. 2004) and CCR5 (Baker et al. 2007) receptors were partially confined in domains, whereas the remainder of the receptors, 70 and 25%, respectively, had long distance diffusion. By contrast, hMOP receptors (in neuroblastoma) were found to have diffusion totally restricted to permeable domains (Saulière et al. 2006). The first SPT study dedicated to a G-protein coupled receptor was carried out by Choquet’s laboratory

and involved the neurotransmitter receptor, mGluR5 (Serge et al. 2002). Receptor trajectories, tracked at the surface of neurons, displayed alternating periods of fast random diffusion and slow confined diffusion; the latter had slower long-range superimposed diffusion. We analysed the hMOP receptor at the surface of NRK cells by SPT. Ninety percent of the hMOP receptors displayed permanent behaviour similar to the precedent slow period, including a short-term confined diffusion and a long-term random walk. A quadratic increase in the diffusion coefficient (D) with domain size (L), found to be between 30 and 550 nm, could not be explained by the “skeleton picket and fence model” (Fujiwara et al. 2002). Instead of hop diffusion, hMOP receptors consistently displayed short-term diffusion confined to a domain, which also diffuses. This is termed a “walking confined diffusion” (Fig. 2). We statistically analysed the trajectories, and concluded that the confinement was most probably due to attractive inter-protein interactions; thus, we proposed a simple Brownian model that was consistent with our experimental results (Daumas et al. 2003; Meilhan et al. 2006). Another group subsequently obtained contradictory results on the same receptor expressed transiently in similar cells (Suzuki et al. 2005). Suzuki et al. (2005), using single fluorescent molecules and high-speed single particle tracking, found that rat MOP undergoes rapid hop diffusion over a double-mesh-sized (about 200 and 700 nm) network, according to the “skeleton picket and fence model” (Fig. 2). By contrast, two other GPCRs were found

Table 2 Diffusion characteristics of G-protein-coupled receptors found in literature data

GPCR family	Cell type	Techniques	Conditions	Diffusion type	L (nm)	$M^{R(\text{nm})}(\%)$	Behaviour origin	References
Neurokinine								
NK1-R	HEK293	SMT	Agonist $\times t = 0$ Agonist $\times t = 1$ s	Conf.	500 and 88 ↓		-	(Lill et al. 2005)
NK2-R	HEK293	vrFRAP	Free	Partially conf.	420	~L/R	-	(Cezanne et al. 2004)
	HEK293		Agonist	Partially conf.	170	~L/R	Coated pits	
Adrenergic								
β_2 AR	Chang liver cell	FRAP	Antagonist ^a	-		20 ^{2,25}	Clustering	(Henis et al. 1982)
β_2 AR*	HEK293	cFRAP	Free	-		40 ^{1,6}	-	(Barak et al. 1997)
β_2 AR	Neuron, epithelial cell	FCS	Agonist ^a	-			Coated pits	(Hegener et al. 2004)
Opioid								
hMOR ^a	NRK	SPT	Free	Conf.	200		Inter-protein int.	(Daumas et al. 1982)
MOR ^a	NRK	SPT(25 μ s)	Free	Conf.	210		Actin	(Suzuki et al. 2005)
	NRK	SPT(2.5 μ s)	Latrunculin B	Conf.	320		-	
hMOR ^a	SH-SY5Y	vrFRAP	Free	Conf.	700	~L/R	-	(Sauliere et al. 2006)
Neurotransmitter								
mGluR5 ^a	Ptk2, neuron	SPT	Free	Transiently conf.	ND		Scaffolding protein	(Serge et al. 2002)
	Ptk2, neuron	SPT	Agonist	Transiently conf.	ND		Protein int. (G-protein)	
	Ptk2, neuron	SPT	Homer	Transiently conf.	ND		-	
mGluR5 ^a	NIH3T3, neuron	SPT	Free	Directed			Actin, microtubule	(Serge et al. 2003)
	NIH3T3, neuron	SPT	Taxol	Directed			-	
	NIH3T3, neuron	SPT	Nocodazole + cyto. D	Random			-	
	CHO	cFRAP	Free	-		70 ^{1,4}	-	(Pucadyil et al. 2004)
5HT _{1A} -R ^a	CHO	cFRAP	Antagonist	-		→	Protein int. (G-protein)	
	CHO	cFRAP	Agonist	-		→		
	CHO	cFRAP	G-protein decoupling	-		→		
	CHO	vrFRAP	Free	Random		75	-	(Pucadyil and Chattopadhyay 2007)
CHO	vrFRAP	M/ β CD	Conf.			~L/R		
Hormone								
LH-R	Luteal cell	FRAP	Agonists ^a	-		$\approx 30^1$	-	(Niswender et al. 1985)
LH-R ^a	CHO	cFRAP	Free	-		50 ^{0,4}	-	(Horvat et al. 1999)
	CHO	cFRAP	Agonists	-		↓	-	
LH-R	HEK293	fpFRAP	Agonists ^a (hCG and LH)	-		70 and 45	Report int. + actin	(Roess et al. 2000)
	HEK293	fpFRAP	hCG ^a + cyto D	-		↑	-	
	HEK293	fpFRAP	LH ^a + cyto D	-		↓	-	

Table 2 continued

GPCR family	Cell type	Techniques	Conditions	Diffusion type	L (nm)	$M^R(\text{um})$ (%)	Behaviour origin	References
LH-R ^a	CHO	SPT	Free	Conf.	115	-	-	(Smith et al. 2006)
	CHO	SPT	Agonist (hgc)	Conf.	43	-	Cholesterol	
	CHO	SPT	M β CD + agonist	Conf.	75	-	-	
V2-R	LLC-PK ₁	mpFMP	Agonist ^a	-	-	90 ²	-	(Jans et al. 1989)
V2-R	LLC-PK ₁	mpFMP	Agonist ^a	-	-	↓	Coated pits	(Jans et al. 1990a)
V1-R	A7R5	mpFMP	Agonist ^a	-	-	36 ²	-	(Jans et al. 1990b)
GnRH-R ^a	CHO, α T3	cFRAP	Free	-	-	80 ^{0.4}	-	(Nelson et al. 1999)
	CHO, α T3	cFRAP	Agonist	-	-	↓	Protein int	
	CHO, α T3	cFRAP	Antagonist	-	-	→	-	
Chemokine								
CCR5 ^a	CHO, HEK 293	cFRAP	Free	-	-	100 ND	Cholesterol	(Steffens and Hope 2004)
	HeLa, HOS	cFRAP	M β CD	-	-	↓	-	
CCR5 ^a	HEK293	vrFRAP	Free	Conf.	1500	~L/R	-	(Baker et al. Submitted)
	HEK293	vrFRAP	co-receptor CD4	Partially conf.	340	~L/R	Protein int. (CD4)	
CXCR1 ^a	HEK293	cFRAP	Free	-	-	100 ND	-	(Jiao et al. 2005)
	HEK293	cFRAP	Agonist	-	-	↓	-	
Miscellaneous								
OR17-40-R ^a	HEK293	SMT	Free	Partially conf.	150 and 350	-	Coated pits	(Jacquier et al. 2006)
	HEK293	SMT	Agonist	Partially conf.	↓	-	Coated pits	
		SMT	Antagonist	Partially conf.	↓	-	Coated pits	
GRP-R ^a	KNRK	cFRAP	Free	-	-	80 ^{2.6}	-	(Young et al. 2001)
	KNRK	cFRAP	Agonist	-	-	↓	Protein int.	
	KNRK	cFRAP	c-Src inhibitor + agonist	-	-	→	-	
CCK-R	CHO,	FRAP	Partial agonista	-	-	88 ^{0.5}	Coated pits	(Roettger et al. 1999)
	Pancreatic acini					58 ^{0.5}		

cFRAP confocal FRAP mpFRAP microphotolysis measurements, fFPR fringe fluorescence photobleaching recovery, FCS fluorescence correlation spectroscopy, SPT single particle tracking (at 40 ms time resolution except otherwise mentioned), SMT single molecule tracking, M β CD Methyl- β -cyclodextrin, conf. confined, int. interaction, ND not determined, L confinement domain size, M mobile fraction, R observation radius in FRAP measurements

^a Fluorescent labelled molecule

to exhibit similar diffusion behaviour as that reported in our study, including a short-term confined diffusion and a long-term long-range diffusion compatible with $D \sim L^2$: (1) the odorant receptor OR17-40 was analysed by single molecule tracking at the surface of HEK cells (Jacquier 2005) and (2) the luteneinizing hormone receptor LHR was monitored by single particle tracking at the surface of CHO cells (Smith et al. 2006). In the following sections, we will examine the diverse possible origins of confined diffusion.

G-protein-coupled receptors trajectories, in addition to compartmentalisation, display directed diffusion, combining random diffusion and displacement at a constant velocity in a preferred direction (Fig. 2). Such behaviour, for neurotransmitter receptors, has been shown to be due to interactions of the receptors with cytoskeleton actin filaments and microtubules. This behaviour has been detected for mGluR5 in cellular regions that have a highly dynamic cytoskeleton, including neuronal growth cones and fibroblast lamellipodia (Serge et al. 2003). This process may play a role in receptor targeting specific sites and in its lateral organisation. The directed diffusion observed for the opioid receptor hMOP was attributed to its entry into the internalisation pathway (Daumas et al. 2003); consistent with the expected membrane receptor recycling rate and the increase from 10 to 50% of this population for agonist bound receptors (Daumas et al., unpublished data).

There are few comparable studies that analyse the same receptor in distinct cells; however, they suggest a similar overall behaviour, but the major changes that are reported relate to the proportion of receptors with various types of movement (Daumas et al. 2003; Serge et al. 2002, 2003) and Saulière et al. unpublished results.

Temperature has a role

Although recommended for the maintenance of physiological conditions, some studies have not been performed at 37°C, but rather at room temperature to limit receptor endocytosis. This was particularly the case for receptor behaviour in the presence of its agonist ligand. Here, induced internalisation of the receptor disturbs its diffusion. However, sucrose, known to selectively inhibit the clathrin-mediated endocytosis, offers an interesting alternative for decreasing the temperature to avoid the internalisation of the receptors (Jacquier et al. 2006; Young et al. 2001). Nevertheless, lowering the temperature can have a much more complex effect than uniquely decreasing the thermal agitation temperature, which varies the diffusion coefficient according to the Arrhenius law. Indeed, the diffusion measurements by fluorescence microphotolysis (a variant of the FRAP technique) performed at various temperatures show different effects on two isoforms of the vasopressin receptor

bound to their agonist ligand. V1R exhibits a decrease in the diffusion coefficient after decreasing the temperature from 37 to 22°C, with no effect on the mobile fraction. However, a similar decrease in the V2R diffusion coefficient is accompanied by a 30% loss in the mobile fraction (Jans et al. 1990b; Jans et al. 1989). More striking is the immobilisation of V2-R, observed after the temperature is lowered from 37 to 10°C. By contrast, the lipids remain in a highly fluid state, as demonstrated by the mobile fraction being close to 100%, and the diffusion coefficient decreasing by about factor 4. A temperature change can also differentially affect the various populations of a given receptor, with each having different diffusion behaviours. In our study of hMOR by SPT, the diffusion coefficient of the receptors with directed diffusion increased by a factor of about 10, after the temperature was raised from 22 to 37°C. At the same time, the diffusion coefficient of the receptors with short-term walking confined diffusion was lowered by a similar factor (and accompanied by a decrease of the domain size by a factor 2, in rough agreement with $D \sim L^2$) (Daumas et al. 2003). These opposing changes may compensate one another and may explain the absence of variation in the hMOR diffusion coefficient, as measured by FRAP for similar temperature values (Saulière et al. 2006). Together, these results indicate that temperature has subtle effects on the dynamic organization of membrane constituents, probably due to thermally controlled biological processes. These processes make it difficult to assign the origins of observed behaviours.

Ligand binding affects the receptor diffusion

Antagonist ligands represent a large proportion of therapeutic agents targeting GPCR, but the molecular events following their binding to a GPCR are poorly documented. The current view is that antagonist binding prevents further activation by an agonist and does not give rise to a pharmacological response. The same is true for diffusion studies, which only rarely compare the free and antagonist-bound receptor. However, interestingly we found various contrasting situations in the literature: no modification of the 5-HT_{1A} receptor diffusion (in contrast to the agonist) (Pucadyil et al. 2004), decreases in the domain size and diffusion coefficient inside the domains (similar to the agonist) for the odorant receptor OR17-40 mainly found in compartments (Jacquier et al. 2006) and, for GnRH-R, a decrease in the diffusion coefficient at constant mobile fraction (whereas this was lowered by the agonist) (Nelson et al. 1999). These contradictory results question the effect of antagonist binding, and whether it may be more complicated than simply “blocking” the receptor. In turn, these results should encourage further

investigation into the biochemical and diffusional aspects of antagonist binding.

The agonist is responsible for activating the signalling cascade; therefore, changes in the receptor dynamics induced by an agonist received much more attention. In contrast to the antagonist, there is a remarkable convergence of the literature data by FRAP and SPT or SMT. In general, the diffusion coefficient, the domain size and/or the mobile fraction decreased. The first evidence of this was obtained by FRAP studies of hormone receptors. GnRH activation of gonadotropin-releasing hormone receptor decreased its mobile fraction from 80 to 50% and lowered its diffusion coefficient by a factor of 3 (Nelson et al. 1999). Two agonists of luteneizing hormone receptors led similarly to significant decreases from about 55–20% for the mobile fraction and by a factor of 2–100 for the diffusion coefficient (Horvat et al. 1999). We analysed the NK2 receptor and lipid diffusion by vrFRAP. The confined NK2 receptors are distributed in domains, whose size is reduced from 420 to 170 nm, in the presence of the agonist. At the same time, the diffusion coefficient inside the domains significantly decreased from 10^{-1} to 10^{-3} $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Colocalization of the receptor with β -arrestin and transferrin receptor supported that the small domains corresponded to clathrin coated pits (Cezanne et al. 2004). It has been proposed that entry into the endocytotic process results in domain size and diffusion coefficient reduction for several other receptors. Clathrin recruitment of receptors was suggested to explain the more constrained diffusion of NK1-R as a function of time (down to about 175 nm) during the first 1,000 ms following binding of the agonist (Lill et al. 2005), and the partitioning of OR17-40 into smaller domains of 190 nm in the presence of agonist (Jacquier et al. 2006). The persistence of the decrease of lateral mobility of CCK receptor after agonist or partial agonist binding after acid-induced dissociation of the agonist underlined a role in this behaviour of the internalization of this receptor (Roettger et al. 1999). FCS measurements of ligand bound β_2 adrenergic receptors revealed two populations of diffusing bound receptors—the low mobility population was consistent with internalization of β_2 AR (Hegener et al. 2004; Meissner and Haberlein 2003).

Nevertheless, the slowing down, and even the immobilisation of the receptors after agonist binding has been also found to be independent of endocytosis. Young et al. (2001) observed the contradictory effects of various treatments blocking the bombesin/gastrin releasing-peptide (GRP) receptor internalization. Young et al. (2001) demonstrated that the agonist-induced decrease of the mobile fraction was dependent on c-Src activity. They further argued for a possible role of this MAPkinase in mediating the multi-protein complex responsible for GRP-R immobilisation (Young et al. 2001). However, the dissociation from

internalisation remains questionable, as c-Src is known to interact with β -arrestin and dynamin involved in the clathrin-coated pits (Claing et al. 2002). Analysis of LH-R by SPT revealed that the receptors have confined diffusion into domains of 230 nm size, which is reduced to 85 nm in the presence of the hCG agonist with the calculated diffusion coefficient inside the domains decreasing by a factor of 10 (Smith et al. 2006). The effect of agonist addition was reversed by methyl- β cyclodextrin cholesterol depletion. This reversal correlated well with the inhibition of the agonist-dependent localisation of the receptors in the detergent-resistant membrane fractions of sucrose gradients. This putative promotion of ligand-induced partitioning of receptors with lipid rafts accompanied by a decrease in receptor mobility had been previously suggested for the human CXCR1 chemokine receptor (Jiao et al. 2005). Without discussing the controversial area of lipid rafts in membrane biology (Munro 2003; Pike 2003), which is largely beyond the scope of this review, we point out the extreme difficulty, as illustrated by the existence of contradictory results (Kwik et al. 2003; Vrljic et al. 2005), in assessing the presence of a molecule in raft domains from diffusion measurements in cholesterol depleted cells.

In contrast to the results that have preceded, neurotransmitter receptors exhibit an increase in the diffusion coefficient after agonist binding, probably due to the G-protein uncoupling consecutive to receptor activation. This was first proposed to explain the threefold increase in mGluR5 mobility (Serge et al. 2002), and it was later demonstrated to be at the origin of the moderate, but significant, mobility increase by agonist binding for 5HT_{1A}-R (Pucadyil et al. 2004).

Confinement of the receptors: origin and regulation

As suggested by the biochemical studies for GPCR signalling, GPCR diffusion analysis gives strong evidence for their compartmentalisation and definitively rules out the collision-coupling model. The various findings reported here emphasise the tremendous work that remains to be achieved for a clear view of the organization of these systems to emerge. Several sources of confinement, including the cytoskeleton, and the protein-protein and the protein-lipid interactions appear to be involved and understanding their origin and their mode of regulation presents a challenging question.

Besides its role in the intracellular and plasma membrane traffic of the receptors, the cytoskeleton is thought to act as a barrier to the diffusion of receptors, restricting their movements (Fig. 2) (Suzuki et al. 2005). This suggestion relies on the conjugated observations of hop diffusion and an increase in the compartment sizes after partial destabilisation

of the actin meshwork. Similar findings exist for a variety of proteins (Marguet et al. 2006) and lipids (Fujiwara et al. 2002). If undoubtedly, the cytoskeleton appears to compartmentalise membrane protein diffusion by a simple obstruction mechanism, more subtle effects are probably involved as the signalling partners encounter and interact. Nevertheless, the cytoskeleton is specifically involved in the confinement of the receptors after it is attached to scaffolding proteins recruited by (or recruiting) the receptors (Choquet and Triller 2003).

As found in a large part of the data, protein-protein interactions represent the predominant source of the compartmentalisation for receptors and their modulation. In this context, the diffusion coefficient being dependent on domain size is consistent with confinement due to protein-protein attractive interactions. Various groups have observed similar behaviour for several receptors and cellular systems independently providing encouragement for further work in this direction to determine the nature of the dominating interactions. We can reasonably suggest that these interactions take place between membrane proteins in the membrane. These interactions also take place in the cytoplasmic neighbourhood of the membrane, between cytosolic proteins coupled to the receptor and intracellular parts of other proteins (see Fig. 2). In this respect, the changes to the receptor diffusion observed in the presence of ligands or the disruption of interactions of the receptors with protein partners provide very useful information. The binding of the agonist, which more frequently reduces receptor mobility and confinement size and thus apparently reinforces the interaction, is accompanied by conformational changes. On one hand, these could result in a modulation of dipole-dipole interactions between helices of neighbouring proteins. On the other hand, owing to a possible resulting change in the hydrophobic length of the receptor (Salamon et al. 2002), it would modulate lipid-mediated attractive protein-protein interactions, as expected in conditions of hydrophobic mismatch. For such conjectures to be tested, there is a crucial need of experiments to be performed on membrane model systems, which offer the possibility of tuning the relevant factors. The role of cytosolic proteins in the confinement of the receptors is well established, especially in the extreme case of trapping the receptors in clathrin-coated pits. However, there are many other proteins, identified or not, which interact with GPCR after its activation (Bockaert and Pin 1999), thereby affecting receptor diffusion. This has been shown effectively in various elegant studies, in which the state of coupling of the G-protein was modulated (Pucadyil et al. 2004; Serge et al. 2002). The observed effects on the mobility of the receptors vary after agonist binding: an increase for neurotransmitter receptors (associated to G-protein decoupling) and a decrease for other receptors (attributed to endocytosis).

These discrepancies could be only apparent and due to the dependence of the kinetics of the respective signalling and internalization events as a function of the receptors and/or cellular expression systems.

The eventual partitioning of the activated receptors in lipid microdomains, as suggested by Smith et al. and Jiao et al. (Jiao et al. 2005; Smith et al. 2006), would involve lipid-protein interactions. Indeed, these domains are the putative *in vivo* correlate of detergent-resistant membrane fractions enriched in cholesterol, sphingolipids and saturated glycerophospholipids (Pike 2006), which are characterised by a thickness larger than that of the surrounding membranes (Gandhavadi et al. 2002). The process driving the recruitment of receptors in these domains or the formation of such domains around the receptors would be to satisfy matching conditions between the hydrophobic cores of receptors and lipids (Fig. 2). The partitioning in liquid-ordered domains of agonist-bound delta opioid receptor in model membrane systems (Alves et al. 2004) supports this suggestion. Comparative diffusion analysis by SPT on model and cell plasma membranes suggests that lipid microdomains might be identified by transient confinement zones on the trajectories [Fig. 2, (Dietrich et al. 2002)]. However, detecting these lipid microdomains at the surface of living cells is still a delicate problem (Lagerholm et al. 2005). If partitioning of GPCRs in rafts is confirmed, it would be of particular interest to understand how this could be related to the effects of cholesterol content on the pharmacological properties of these receptors (Gimpl et al. 2002; Harikumar et al. 2005).

Perspectives

Only very few studies have been devoted to the diffusion analysis of GPCRs, in comparison to the extent that this receptor family has been studied and its major interest as a therapeutic molecule target. However, they demonstrate their potential for unravelling the molecular mechanisms of the GPCR signal transduction. Two major diffusion modes have been detected: directed diffusion probably involved in the redistribution of receptors at (or to) specific sites and confined diffusion presumably favouring the interactions with the signal transduction partners. The overall understanding of the machinery requires the investigation of the associated partners, G-proteins, but also effectors. There is even less data on these proteins and this does not enhance our understanding of the dynamic organisation of this complex system. Now, to further this challenging issue, there is an absolute need for the simultaneous analysis of the diffusion of the various signalling partners using emerging techniques for multicolour detection.

Acknowledgments The authors would like to thank F. Daumas and F. Viala for their help in editing the figures. We apologize in advance to the authors whose work we have omitted.

References

- Alves ID, Cowell SM, Salamon Z, Devanathan S, Tollin G, Hruby VJ (2004) Different structural states of the proteolipid membrane are produced by ligand binding to the human delta-opioid receptor as shown by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *Mol Pharmacol* 65:1248–1257
- Baker A, Sauliere A, Gaibelet G, Lagane B, Mazeres S, Fourage M, Bachelierie F, Salome L, Lopez A, Dumas F (2007) CD4 interacts constitutively with multiple CCR5 at the plasma membrane of living cells: a vFRAP approach. *J Biol Chem* (to appear)
- Barak LS, Ferguson SS, Zhang J, Martenson C, Meyer T, Caron MG (1997) Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact beta2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol Pharmacol* 51:177–184
- Bates IR, Wiseman PW, Hanrahan JW (2006) Investigating membrane protein dynamics in living cells. *Biochem Cell Biol* 84:825–831
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18:1723–1729
- Bouzigues C, Dahan M (2007) Transient directed motions of GABA(A) receptors in growth cones detected by a speed correlation index. *Biophys J* 92:654–660
- Burack WR, Shaw AS (2000) Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr Opin Cell Biol* 12:211–216
- Calvert PD, Govardovskii VI, Krasnoperova N, Anderson RE, Lem J, Makino CL (2001) Membrane protein diffusion sets the speed of rod phototransduction. *Nature* 411:90–94
- Carman CV, Som T, Kim CM, Benovic JL (1998) Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 273:20308–20316
- Cezanne L, Lecat S, Lagane B, Millot C, Vollmer JY, Matthes H, Galzi JL, Lopez A (2004) Dynamic confinement of NK2 receptors in the plasma membrane. Improved FRAP analysis and biological relevance. *J Biol Chem* 279:45057–45067
- Chen Y, Lagerholm BC, Yang B, Jacobson K (2006) Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* 39:147–153
- Chidiac P (1998) Rethinking receptor-G protein-effector interactions. *Biochem Pharmacol* 55:549–556
- Choquet D, Triller A (2003) The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* 4:251–265
- Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66:61–79
- Daumas F, Destainville N, Millot C, Lopez A, Dean D, Salome L (2003) Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophys J* 84:356–366
- Daumas F, Mazarguil H, Millot C, Lopez A, Salome L (2002) Probing functionalized gold colloids for single particle tracking experiments. *Biochem Biophys Res Commun* 295:610–615
- Destainville N, Salome L (2006) Quantification and correction of systematic errors due to detector time-averaging in single-molecule tracking experiments. *Biophys J* 90:L17–L19
- Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, Kusumi A, Jacobson K (2002) Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys J* 82:274–284
- Digby GJ, Lober RM, Sethi PR, Lambert NA (2006) Some G protein heterotrimers physically dissociate in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17789–17794
- Engelman DM (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438:578–580
- Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* 157:1071–1081
- Gales C, Rebois R, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert T, Bouvier M (2005) Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2:177–184
- Gales C, Van Durm J, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H, Bouvier M (2006) Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* 13:778–786
- Gandhavadi M, Allende D, Vidal A, Simon SA, McIntosh TJ (2002) Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys J* 82:1469–1482
- George N, Pick H, Vogel H, Johnsson N, Johnsson K (2004) Specific labeling of cell surface proteins with chemically diverse compounds. *J Am Chem Soc* 126:8896–8897
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56:615–649
- Gimpl G, Burger K, Fahrenholz F (2002) A closer look at the cholesterol sensor. *Trends Biochem Sci* 27:596–599
- Harikumar KG, Puri V, Singh RD, Hanada K, Pagano RE, Miller LJ (2005) Differential effects of modification of membrane cholesterol and sphingolipids on the conformation, function, and trafficking of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. *J Biol Chem* 280:2176–2185
- Hegener O, Prenner L, Runkel F, Baader SL, Kappler J, Haberlein H (2004) Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry* 43:6190–6199
- Henis YI, Hekman M, Elson EL, Helmreich EJ (1982) Lateral motion of beta receptors in membranes of cultured liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2907–2911
- Horvat RD, Nelson S, Clay CM, Barisas BG, Roess DA (1999) Intrinsically fluorescent luteinizing hormone receptor demonstrates hormone-driven aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 255:382–385
- Huet S, Karatekin E, Tran VS, Fanget I, Cribier S, Henry JP (2006) Analysis of transient behavior in complex trajectories: application to secretory vesicle dynamics. *Biophys J* 91:3542–3559
- Hur EM, Kim KT (2002) G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* 14:397–405
- Jacquier V (2005) Functional characterization of a human odorant receptor. *Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, Lausanne*
- Jacquier V, Prummer M, Segura JM, Pick H, Vogel H (2006) Visualizing odorant receptor trafficking in living cells down to the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:14325–14330
- Jans DA, Peters R, Fahrenholz F (1990a) An inverse relationship between receptor internalization and the fraction of laterally mobile receptors for the vasopressin renal-type V2-receptor. An active role for receptor immobilization in down-regulation? *FEBS Lett* 274:223–226
- Jans DA, Peters R, Fahrenholz F (1990b) Lateral mobility of the phospholipase C-activating vasopressin V1-type receptor in A7r5 smooth muscle cells: a comparison with the adenylate cyclase-coupled V2-receptor. *Embo J* 9:2693–2699
- Jans DA, Peters R, Zsigo J, Fahrenholz F (1989) The adenylate cyclase-coupled vasopressin V2-receptor is highly laterally mobile in membranes of LLC-PK1 renal epithelial cells at physiological temperature. *Embo J* 8:2481–2488

- Jiao X, Zhang N, Xu X, Oppenheim JJ, Jin T (2005) Ligand-induced partitioning of human CXCR1 chemokine receptors with lipid raft microenvironments facilitates G-protein-dependent signaling. *Mol Cell Biol* 25:5752–5762
- Kallal L, Benovic JL (2000) Using green fluorescent proteins to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 21:175–180
- Kenakin T (2002) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev* 11:103–110
- Kristiansen K (2004) Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 103:21–80
- Kwik J, Boyle S, Fooksman D, Margolis L, Sheetz MP, Edidin M (2003) Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13964–13969
- Lagerholm BC, Weinreb GE, Jacobson K, Thompson NL (2005) Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu Rev Phys Chem* 56:309–336
- Lill Y, Martinez KL, Lill MA, Meyer BH, Vogel H, Hecht B (2005) Kinetics of the initial steps of g protein-coupled receptor-mediated cellular signaling revealed by single-molecule imaging. *Chemphyschem* 6:1633–1640
- Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J* 25:3446–3457
- Meilhac N, Le Guyader L, Salome L, Destainville N (2006) Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 73:011915
- Meissner O, Haberlein H (2003) Lateral mobility and specific binding to GABA(A) receptors on hippocampal neurons monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 42:1667–1672
- Munro S (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115:377–388
- Nelson S, Horvat RD, Malvey J, Roess DA, Barisas BG, Clay CM (1999) Characterization of an intrinsically fluorescent gonadotropin-releasing hormone receptor and effects of ligand binding on receptor lateral diffusion. *Endocrinology* 140:950–957
- Neubig RR (1994) Membrane organization in G-protein mechanisms. *FASEB J* 8:939–946
- Niswender GD, Roess DA, Sawyer HR, Silvia WJ, Barisas BG (1985) Differences in the lateral mobility of receptors for luteinizing hormone (LH) in the luteal cell plasma membrane when occupied by ovine LH versus human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 116:164–169
- Pike LJ (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44:655–667
- Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J Lipid Res* 47:1597–1598
- Pucadyil TJ, Chattopadhyay A (2007) Cholesterol depletion induces dynamic confinement of the G-protein coupled serotonin(1A) receptor in the plasma membrane of living cells. *Biochim Biophys Acta* 1768:655–668
- Pucadyil TJ, Kalipatnapu S, Harikumar KG, Rangaraj N, Karnik SS, Chattopadhyay A (2004) G-protein-dependent cell surface dynamics of the human serotonin1A receptor tagged to yellow fluorescent protein. *Biochemistry* 43:15852–15862
- Rebois R, Robitaille M, Gales C, Dupre D, Baragli A, Trieu P, Ethier N, Bouvier M, Hebert T (2006) Heterotrimeric G proteins form stable complexes with adenylyl cyclase and Kir3.1 channels in living cells. *J Cell Sci* 119:2807–2818
- Roess DA, Horvat RD, Munnely H, Barisas BG (2000) Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane. *Endocrinology* 141:4518–4523
- Roettger BF, Pinon DI, Burghardt TP, Miller LJ (1999) Regulation of lateral mobility and cellular trafficking of the CCK receptor by a partial agonist. *Am J Physiol* 276:C539–C547
- Sako Y, Yanagida T (2003) Single-molecule visualization in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol Suppl* SS1–SS5
- Salamon Z, Hruby VJ, Tollin G, Cowell S (2002) Binding of agonists, antagonists and inverse agonists to the human delta-opioid receptor produces distinctly different conformational states distinguishable by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J Pept Res* 60:322–328
- Salome L, Cazeils JL, Lopez A, Tocanne JF (1998) Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. *Eur Biophys J* 27:391–402
- Sauliere A, Gaibelet G, Millot C, Mazeres S, Lopez A, Salome L (2006) Diffusion of the mu opioid receptor at the surface of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is restricted to permeable domains. *FEBS Lett* 580:5227–5231
- Serge A, Fourgeaud L, Hemar A, Choquet D (2002) Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J Neurosci* 22:3910–3920
- Serge A, Fourgeaud L, Hemar A, Choquet D (2003) Active surface transport of metabotropic glutamate receptors through binding to microtubules and actin flow. *J Cell Sci* 116:5015–5022
- Smith SM, Lei Y, Liu J, Cahill ME, Hagen GM, Barisas BG, Roess DA (2006) Luteinizing hormone receptors translocate to plasma membrane microdomains after binding of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 147:1789–1795
- Steffens CM, Hope TJ (2004) Mobility of the human immunodeficiency virus (HIV) receptor CD4 and coreceptor CCR5 in living cells: implications for HIV fusion and entry events. *J Virol* 78:9573–9578
- Suzuki K, Ritchie K, Kajikawa E, Fujiwara T, Kusumi A (2005) Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophys J* 88:3659–3680
- Tirat A, Freuler F, Stettler T, Mayr LM, Leder L (2006) Evaluation of two novel tag-based labelling technologies for site-specific modification of proteins. *Int J Biol Macromol* 39:66–76
- Tolkovsky AM, Levitzki A (1978) Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylyl cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry* 17:3795
- Tsunoda S, Sierralta J, Sun Y, Bodner R, Suzuki E, Becker A, Socolich M, Zuker CS (1997) A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388:243–249
- Vrljic M, Nishimura SY, Moerner WE, McConnell HM (2005) Cholesterol depletion suppresses the translational diffusion of class II major histocompatibility complex proteins in the plasma membrane. *Biophys J* 88:334–347
- Wawrezynieck L, Rigneault H, Marguet D, Lenne PF (2005) Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys J* 89:4029–4042
- Wenger J, Conchonaud F, Dintinger J, Wawrezynieck L, Ebbesen TW, Rigneault H, Marguet D, Lenne PF (2006) Diffusion analysis within single nanometric apertures reveals the ultrafine cell membrane organization. *Biophys J* 92:913–919
- White J, Stelzer E (1999) Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol* 9:61–65
- Young SH, Walsh JH, Rozengurt E, Slice LW (2001) Agonist-dependent immobilization of chimeric bombesin/GRP receptors: dependence on c-Src activity and dissociation from internalization. *Exp Cell Res* 267:37–44

ABSTRACT

The G protein coupled receptors represent the largest membrane protein family and are involved in numerous cellular processes. The agonist binding leads to the interaction between the receptor, the heterotrimeric G protein and the effector. Despite the multiplicity of different partners existing at the plasma membrane, GPCR are able to transmit the signal with specificity and efficiency. We address the question of the existence of a specific membrane organization which could favor interactions between the receptor, the G protein and the effector. We choose the human mu opioid receptor (hMOR) as a model for the GPCR superfamily. Here we examine the lateral diffusion and the dynamic organisation of hMOR in regard to its activation by ligands and to membrane environment modifications.

The mu opioid receptor, in fusion with EGFP and a T7 peptide in N-terminal, was stably expressed in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y which contains endogenous hMOR and is thus relevant for this study. The pharmacological properties of T7-EGFP-hMOR were first checked, and the receptor is found to be fully functional. Then its mobility analysis was achieved using two complementary biophysical approaches which are vrFRAP (variable radii Fluorescence Recovery After Photobleaching) and SPT (Single Particle Tracking). The first one proceeds by ensemble measurement whereas the second one is a single molecule scale analysis.

At room temperature these analyses reveal a double compartmentation of the receptors in permeable domains (about 1 μm radius) and in smaller domains (200 nm radius). Moreover receptors exhibiting a directed diffusion are observed. A variation of the temperature induces a modification of the receptors diffusion. The SPT analyses reveal that hMOP receptors observed at physiological temperature mainly exhibit a directed diffusion mode, with a diffusion coefficient slightly increasing. On the contrary, receptors showing another diffusion mode are slowing down.

In order to determine the sources of the receptor organisation, the actin cytoskeleton was partially destroyed, and G protein/receptor interaction was impeded. Our results show that the interaction of the receptor with G proteins is at the origin of the largest receptors domain. Moreover the cortical cytoskeleton influences the receptor membrane organisation, in particular for receptors having directed diffusion. It appears that many parameters are playing a part in the complex receptor organisation.

Furthermore we compare by vrFRAP the hMOR diffusion after agonist or antagonist binding. Antagonists don't modify the receptor organisation in permeable sub-micrometer size domains. On the contrary agonists induce a decrease of both the domain size and the diffusion coefficient.

Our results highlight the influence of numerous parameters: temperature, G protein, actin cytoskeleton and receptor activation state, on the hMOR dynamic organisation. They demonstrate the interest of a conjoint use of vrFRAP and SPT approaches to obtain a global vision of a protein plasma membrane organisation.

AUTEUR : Aude SAULIERE

TITRE : Etapes membranaires de la transduction du signal par les récepteurs couplés aux protéines G : organisation dynamique du récepteur mu aux opioïdes humains à la surface de neuroblastomes

DIRECTEUR DE THESE : Laurence SALOME

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 20 Juillet 2007, université Toulouse III

RESUME :

Les récepteurs couplés aux protéines G transmettent le signal de manière efficace et spécifique malgré la grande variabilité de chaque partenaire. Il se pose donc la question de l'existence de domaines membranaires permettant de regrouper les différentes protéines nécessaires. Nous avons donc analysé l'organisation dynamique du récepteur mu opioïde humain (hMOR) en relation avec ses paramètres pharmacologiques et les contraintes de son environnement.

Le récepteur T7-EGFP-hMOR a été surexprimé de manière stable dans des neuroblastomes. Après avoir vérifié sa fonctionnalité, sa dynamique latérale a été étudiée par Retour de Fluorescence Après Photoblanchiment à rayon variable (FRAPrv) et par Suivi de Particule Unique (SPT). A 22°C ces analyses ont révélé une double compartimentation des récepteurs, d'une part dans des domaines perméables de près de 1 µm de rayon, d'autre part dans des domaines de rayon inférieur à 200 nm. De plus, environ un tiers des récepteurs présente une diffusion dirigée. Les effets de la variation de température, de la déstabilisation du cytosquelette d'actine et du blocage de l'interaction protéine G/récepteur ont été observés dans le but de mieux comprendre l'origine des domaines. Bien que tous les paramètres qui participent à la diffusion de hMOR ne soient pas encore déterminés, les résultats indiquent que ces domaines sont dus au précouplage des protéines G. De plus le cytosquelette joue également un rôle dans l'organisation membranaire, notamment au niveau des récepteurs ayant des trajectoires dirigées.

Les effets de la fixation de plusieurs ligands sur la dynamique de hMOR ont également été analysés. Les antagonistes ne modifient pas la diffusion du récepteur, alors que les agonistes entraînent une diminution de la taille des domaines, et un ralentissement des récepteurs en lien avec la transmission du signal et l'internalisation. Nos résultats soulignent l'importance de plusieurs paramètres sur l'organisation dynamique de hMOR et ils confortent l'intérêt de l'utilisation conjointe du FRAP et du SPT.

MOTS-CLES : RCPG, opioïde, hMOR, retour de fluorescence après photoblanchiment, FRAP, suivi de particule unique, SPT, récepteur couplé aux protéines G, organisation membranaire, diffusion latérale.

DISCIPLINE : Biophysique

LABORATOIRE : Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), 205 Route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex