

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**

**Sciences de la Vie et de la Terre**

**MÉMOIRE**

**Présenté**

**Par**

**Françoise ILLIEN**

**Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études**

**Rôle de l'Annexine 2 sur le réarrangement  
des lipides membranaires au cours de la  
différenciation des cellules épithéliales**

**Soutenu le 8 novembre 2010**

**devant le jury suivant :**

**Présidente : Mme GIRAUD GUILLE Marie -Madeleine**

**Rapporteur : Mr CAMADRO Jean - Michel**

**Examineur : Mr MOREL Etienne**

**Tutrice pédagogique : Mme DEMIGNOT Sylvie (*sylvie.demignot@crc.jussieu.fr*)**

**Mémoire préparé sous la direction de : Jesus AYALA-SANMARTIN  
(*jayala@chusa.jussieu.fr*)**

**Laboratoire de :  
Laboratoire des Biomolécules - UMR 7203**

**Directrice : Mme Solange LAVIELLE**

**Laboratoire de :  
Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire - UMRS 872**

**Directeur : Mr Jean CHAMBAZ**

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES  
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

**Rôle de l'Annexine 2 sur le réarrangement des lipides membranaires  
au cours de la différenciation des cellules épithéliales**

**Françoise ILLIEN**

**RÉSUMÉ**

**L'Annexine 2 (Ax2)** est une protéine cytosolique qui a la capacité de fixer les membranes de manière dépendante du calcium via les phospholipides anioniques (PS, PI, PG...). Du point de vue structural, elle est composée de 2 domaines : le domaine cœur, constitué de 4 motifs répétés, chacun contenant un site de liaison au calcium permettant la fixation à la membrane et le domaine N-terminal qui permet la liaison avec la S100A10, son principal partenaire, avec laquelle elle forme un hétérotétramère. L'Ax2 joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires comme le trafic intracellulaire, la stabilisation des microdomaines, la régulation du cytosquelette et la formation des jonctions cellulaires.

Nous nous sommes intéressés au rôle de l'Ax2 dans la formation des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales. Dans les cellules indifférenciées, l'Ax2 est cytosolique puis au cours de la différenciation, elle s'associe à la membrane plasmique. Nous savons qu'elle joue un rôle important dans ce processus car son extinction par des ARNi empêche la formation des jonctions adhérentes et la localisation de la E-cadhérine à la membrane.

L'objectif de mon projet a été d'étudier le rôle de l'Ax2 dans le réarrangement des lipides membranaires au cours de la différenciation des cellules épithéliales.

Pour cela, dans un premier temps, nous avons purifié par fractionnement subcellulaire les membranes enrichies en Ax2 puis nous les avons caractérisés par des analyses protéiques et lipidiques. Trois pics membranaires enrichis en Ax2 ont été détectés dans les cellules différenciées et indifférenciées. Premièrement, nous avons montré un mouvement de l'Ax2 du pic 1 (riche en éléments du cytosquelette) des cellules indifférenciées vers le pic 2 dans les cellules différenciées (riche en cavéoline 1 et ezrine). De plus, une différence de fluidité et de composition lipidique a été observée selon les pics membranaires et selon l'état de différenciation des cellules. Dans un second temps, afin de comprendre le rôle de l'Ax2 sur ces membranes, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle l'Ax2 lors de son mouvement au cours de la différenciation permettrait une réorganisation des lipides et influencerait la fluidité des membranes. Pour cela, par des tests in vitro en spectrofluorescence sur des membranes biologiques et modèles, nous avons montré que l'Ax2 a un effet rigidifiant sur ces membranes en présence de calcium et que cet effet varie selon la température et la composition lipidique.

Enfin, une approche structurale nous a permis d'étudier l'organisation de la protéine lors de sa liaison et de la formation de ponts membranaires en présence ou en absence de calcium et à pH acide. Nous avons montré que la protéine s'organise différemment dans ces conditions :

- En absence de calcium, elle acquiert une conformation étirée (le dimère S100A10 se trouverait entre 2 molécules d'Ax2 et en contact avec la membrane).

- En présence de calcium, elle peut prendre deux conformations, soit fermée (le dimère de S100A10 au centre du complexe entre deux molécules d'Ax2) au niveau des ponts membranaires, soit ouverte (S100A10 accessible à l'extérieur) en dehors des ponts membranaires ce qui rend accessible la S100A10 aux ligands et expliquerait le rôle de l'Ax2 tétramérique dans la régulation de certaines protéines membranaire comme les canaux ioniques.

**MOTS-CLÉS : Annexine 2, différenciation épithéliale, membranes, conformation protéique.**

# Tables des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>5</b>
<b>1 Organisation des cellules épithéliales.....</b>	<b>6</b>
<b>2 Organisation des membranes .....</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Composition des membranes .....</i>	<i>7</i>
2.1.1 Les lipides membranaires.....	7
2.1.2 Les protéines membranaires.....	9
2.2 <i>Asymétrie des membranes.....</i>	<i>9</i>
2.3 <i>Hétérogénéité des membranes .....</i>	<i>9</i>
2.3.1 Le concept des radeaux lipidiques.....	9
2.3.2 Les membranes modèles mimant la membrane biologique.....	10
2.3.3 Structuration membranaire grâce aux protéines .....	11
2.3.3.1 Les cavéolines.....	11
2.3.3.2 L'actine.....	12
2.3.3.3 Les annexines .....	12
<b>3 L'Annexine 2.....</b>	<b>13</b>
3.1 <i>Structure de l'Ax2 .....</i>	<i>13</i>
3.1.1 Ax2 monomérique.....	13
3.1.2 Ax2 tétramérique.....	13
3.1.2.1 La S100A10.....	14
3.1.2.2 L'oligomérisation de l'Ax2 .....	14
3.2 <i>Propriétés de l'Ax2 .....</i>	<i>14</i>
3.2.1 Liaison de l'Ax2 aux membranes.....	14
3.2.1.1 Liaison au calcium.....	14
3.2.1.2 Liaison de l'Ax2 aux phospholipides .....	15
3.2.2 Agrégation des membranes par l'Ax2.....	16
3.2.2.1 Agrégation de vésicules dépendante du calcium .....	16
3.2.2.2 Agrégation de vésicules indépendantes du calcium.....	16
3.2.2.3 Agrégation des membranes par l'Ax2 à pH acide .....	17
3.2.2.4 Modèles d'organisation de l'Ax2 lors de son agrégation aux membranes.....	17
3.2.2.5 Liaison avec le cytosquelette .....	18
3.3 <i>Fonctions de l'Ax2 .....</i>	<i>18</i>
3.3.1 Rôle de l'Ax2 dans le trafic intracellulaire.....	18
3.3.2 Rôle de l'Ax2 dans la formation et la stabilisation des microdomaines membranaires .....	19
3.3.3 Rôle de l'Ax2 dans la régulation des interactions avec le cytosquelette .....	19
3.3.4 Rôle de l'Ax2 dans la mise en place des jonctions cellulaires .....	20
3.3.5 Fonctions extracellulaires.....	20
<b>Références .....</b>	<b>22</b>
<b><i>bibliographiques .....</i></b>	<b><i>22</i></b>

## Abréviations

ARN: Acide ribonucléique  
Ax2: Annexine 2  
Ax2m (p36): Annexine 2 monomérique  
Ax2t (p90): Annexine 2 tétramérique  
Ax2 muté (p33): Annexine 2 tronquée des 31 premiers acides aminés  
Ca<sup>2+</sup> : calcium  
CAM : molécules d'adhésion cellule-cellule  
CCM : Chromatographie sur Couche Mince  
Chol: Cholesterol  
DMEM: "Dulbecco's Modified Eagle Medium"  
Domaine N-ter: domaine N-terminal  
Domaine C-ter: domaine C-terminal  
DRM: Membranes Résistantes aux Détergents  
DLS: "Dynamic light scattering"  
FSC: "Forward scatter"  
JAM "Jonction Adhésion Molecule"  
LUV: "Large Vésicules unilamellar"  
MC: milieu complet  
MDCK: Madin Darby Canine Kidney (cellules épithéliales de rein de chien)  
MSC: milieu sans calcium  
PA: acide phosphatidique  
PBS: "Phosphate buffer saline"  
PC: Phosphatidylcholine  
PE: Phosphatidyléthanolamine  
PG: Phosphatidylglycérol  
PI: Phosphatidylinositol  
PI (4, 5) P2 (PIP2): Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate  
PKC: Protéine Kinase dépendante du Calcium  
PLA2: Phospholipase A2  
PL : Phospholipide  
PS: Phosphatidylsérine  
SSC: "Side scatter"  
tPA: "tissu Plasminogen activator"

# ***Introduction***

## **1 Organisation des cellules épithéliales**

Les épithéliums constituent une barrière entre le milieu extérieur et les différents tissus de l'organisme. Ils jouent un rôle fondamental dans les échanges entre des milieux qu'ils séparent. Pour assurer ces fonctions de barrière et de transport, les cellules épithéliales ont développé une organisation polarisée, en particulier au niveau de leur membrane plasmique qui présente un pôle apical et un pôle basolatéral.

Le pôle apical assure des échanges très sélectifs avec le milieu extérieur avec lequel il est en contact. Le pôle basolatéral assure les échanges entre les cellules de l'épithélium et le milieu interne à travers la membrane basale.

Il existe un rapport direct entre la composition de la membrane plasmique et ses fonctions. Le domaine apical et le domaine basolatéral possèdent une composition en protéines et en lipides spécifiques. Cette différence de composition résulte d'un transport et d'un recyclage spécialisé des protéines et des lipides membranaires.

La formation de l'épithélium et le maintien de la différenciation des cellules épithéliales dépendent de plusieurs types de jonctions. Il existe 3 groupes de jonctions cellulaires : Le pôle basolatéral et apical est délimité par des jonctions serrées ou *zonula occludens* qui maintiennent la séparation entre les deux domaines membranaires et ainsi permettent de limiter la perméabilité de l'épithélium. Plusieurs molécules participent à l'établissement de ces jonctions dont les occludines, les claudines et les JAM (« Junction Adhésion Molécule ») (Matter et al, 2005). En outre, la communication et le passage des solutés et des signaux entre les cellules se font via les jonctions communicantes « gap junctions » par l'intermédiaire des connexines (Gates & Peifer, 2005). Les jonctions adhérentes « *zonula adherens* » permettent l'attachement mécanique des cellules entre elles en associant les éléments du cytosquelette.

Le complexe jonctionnel, comprenant les jonctions adhérentes et les jonctions serrées, joue un rôle clé non seulement dans l'adhésion cellulaire et la polarisation mais aussi dans la régulation des mouvements cellulaires et la prolifération des cellules épithéliales.

Les cellules épithéliales ont la capacité de se polariser en culture en développant d'une part, une bordure en brosse sur le pôle apical et d'autre part un pôle basolatéral. Ces cellules mises en culture, elles initient leur différenciation par la mise en place de contacts entre les cellules qui conduisent à l'établissement des premières jonctions. Au cours de la différenciation, les cellules se polarisent, la composition protéique et lipidique des membranes apicales et basales se met en place pour conduire à des cellules différenciées, fonctionnelles et qui ne prolifèrent plus. En éliminant le calcium dans le milieu de culture de ces cellules épithéliales différenciées, les jonctions adhérentes peuvent être rompues; les cellules ne sont plus polarisées, ni jointives, elles se dédifférencient. Dans notre étude, nous les appellerons les cellules indifférenciées.

### **Organisation moléculaire des jonctions adhérentes :**

La E-cadhérine et les nectines sont les protéines majoritaires au niveau des jonctions adhérentes.

Les **Cadhérines** sont des protéines dont la liaison homotypique est dépendante du calcium et sont par ailleurs, liées à la  $\beta$ -Caténine, qui fixe la  $\alpha$ -Caténine. Cette dernière fixe et régule l'organisation des filaments d'actine (Yamada et al, 2005).

Les **nectines** sont aussi des protéines d'adhésion (CAMS) de la famille des immunoglobulines mais contrairement à la E-Cadhérine, elles sont indépendantes du calcium. Les nectines induisent l'activation des petites protéines G rac et cdc42 qui stimulent la formation

des jonctions adhérentes grâce à la réorganisation du cytosquelette d'actine. Les nectines recrutent les cadhérines au niveau des sites d'adhérence grâce aux protéines associées au cytosquelette d'actine ce qui permet la formation des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales..

L'analyse différentielle des fractions membranaires de cellules polarisées et de cellules cultivées en milieu appauvri en calcium (forme non polarisée) a montré que l'Annexine 2 (Ax2) et la S100A10 sont associées à la membrane latérale et colocalisent avec la cadhérine au niveau des jonctions adhérentes quand les cellules sont polarisées (Yamada et al, 2006 ; Yamada et al, 2005). (cf. chapitre 3.)

## **2 Organisation des membranes**

Les membranes plasmiques isolent le milieu intracellulaire du milieu extérieur tout en assurant une perméabilité sélective à certaines substances. Les membranes interviennent dans de nombreux processus biologiques comme les processus du transport, de la transduction signalétique, de la conversion d'énergie, etc. La membrane plasmique repose sur une charpente dynamique – le cytosquelette – formé d'un réseau de filaments protéiques, qui rend possible la motilité cellulaire, contribue à maintenir la forme de la cellule. Elle permet également la cohésion des tissus et sert de guide pour le transport de molécules indispensables à l'activité cellulaire.

### **2.1 Composition des membranes**

Les membranes biologiques sont constituées essentiellement de protéines et de lipides.

#### **2.1.1 Les lipides membranaires**

Les lipides sont des molécules amphiphiles avec une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Dans un milieu aqueux, les lipides s'organisent pour former des bicouches. Les membranes cellulaires possèdent de très nombreuses espèces lipidiques qui représentent 30 à 50 % de la masse membranaire distribués de façon hétérogène dans tous les organites. La majorité des lipides des membranes biologiques peuvent être regroupés en 3 catégories : les glycérophospholipides, les sphingolipides et les stérols. La membrane du réticulum endoplasmique (RE) est essentiellement constituée de glycérophospholipides insaturés, ce qui la rend très fluide et facilite l'incorporation des protéines néosynthétisées. La membrane plasmique est constituée de glycérophospholipides auxquels s'ajoutent des sphingolipides et du cholestérol en quantités variables selon les types cellulaires. Les membranes des compartiments Golgiens ont une composition intermédiaire entre le RE et la membrane plasmique. Les membranes des endosomes possèdent une composition lipidique proche de celle de la membrane plasmique, plus particulièrement celles des endosomes de recyclage dans les cellules MDCK qui sont enrichies en cholestérol et sphingomyéline (Kobayashi et al, 2002). La distribution des lipides membranaires résulte à la fois de leur biosynthèse, de leur trafic vésiculaire et non vésiculaire et de leur possibilité de diffuser latéralement dans la membrane ou de basculer d'un feuillet membranaire à l'autre (« flip flop »).

#### **✓ Les glycérophospholipides**

Les glycérophospholipides sont les principaux constituants des bicouches membranaires. Ils comportent trois éléments: un squelette à trois carbones, le glycérol, deux

longues chaînes d'acides gras estérifiés au niveau du carbone C1 et C2 et de l'acide phosphorique estérifié au niveau du carbone C3. Le plus abondant est la phosphatidylcholine (PC) qui porte une tête choline. Les autres classes majeures sont dans l'ordre d'importance la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI), l'acide phosphatidique (PA) et le phosphatidylglycérol (PG).

Les propriétés physico-chimiques des différentes classes de phospholipides (PL) varient en fonction de la taille et de la charge nette de leur tête polaire. On peut citer parmi les phospholipides neutres (PL à tête polaire de charge nette nulle) : la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC), la PC étant le lipide membranaire majoritaire (environ 50% des lipides cellulaires totaux) (van Meer, 2005). Parmi les phospholipides anioniques (PL à tête polaire de charge nette négative (-1)), on peut citer la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylinositol (PI) et le phosphatidylglycérol (PG).

### ✓ Les sphingolipides

Les sphingolipides ont la caractéristique commune d'avoir un amino-alcool à chaîne carbonnée : la sphingosine (Fig. 5). Au niveau de la partie hydrophobe, un acide gras saturé ou monoinsaturé peut venir se fixer sur l'amine primaire de la sphingosine et formant ainsi un céramide. C'est sur l'alcool primaire de la sphingosine que peut se fixer le groupement polaire caractéristique de chaque sphingolipide.

La tête polaire des sphingolipides permet de distinguer les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides. Dans les cellules, on distingue le groupement phosphocholine dans le cas de la sphingomyéline (SM) et le mono-oligosaccharide dans le cas des glycérosphingolipides (leur dénomination est alors respectivement cerébroside ou ganglioside). La SM représente 10 à 20 % (en mole) des lipides membranaires alors que les glycosphingolipides et les céramides sont présents dans des quantités mineures (Simons & van Meer, 1988).

### ✓ Les stérols

Ces lipides correspondent à une vaste famille dont le cholestérol est l'un des constituants majeurs de la membrane plasmique. Il représente à lui seul 30 à 40% de la fraction lipidique. La quantité de cholestérol dans les membranes plasmiques est variable mais on considère qu'il y a une molécule de phospholipide par molécule de cholestérol.

Le cholestérol est amphiphile avec un caractère hydrophobe dominant. La partie hydrophobe est caractérisée par quatre cycles rigides coplanaires et une chaîne carbonnée. La partie hydrophile du cholestérol est le groupement hydroxyle sur le cycle opposé à la chaîne carbonnée. Par ailleurs, ce groupement hydroxyle peut être estérifié.

L'insertion du cholestérol dans la bicouche lipidique s'effectue de telle sorte que son groupement hydroxyle (hydrophile) interagit avec les têtes polaires des autres phospholipides et son noyau hydrophobe s'intercale dans les chaînes d'acides gras.

Le cholestérol a, principalement, un rôle structural dans les membranes. À température élevée, le cholestérol tend à diminuer la fluidité de la membrane, probablement en interagissant avec les chaînes hydrocarbonées des phospholipides et des glycolipides. À basse température, le cholestérol aide à prévenir les membranes de la congélation et préserve une fluidité membranaire. Le cholestérol participe à la formation de microdomaines membranaires de type « radeaux » (cf. chapitre 2.5).



### 2.1.2 Les protéines membranaires

Si les lipides membranaires sont essentiels à la compartimentation des cellules et des organites internes, des protéines présentes au sein de la membrane sont également nécessaires pour assurer des fonctions biologiques spécifiques (structurelles et/ou fonctionnelles).

Les protéines membranaires peuvent être classées en deux catégories sur la base de la nature de leurs interactions avec la membrane: les protéines intégrales et les protéines périphériques. La plupart des membranes comportent les deux types de protéines.

✓ **Les protéines membranaires dites intégrales, également appelées protéines intrinsèques**

Elles présentent au moins une partie enfoncée dans la membrane. Certaines protéines intégrales possèdent un ou plusieurs segments protéiques de nature hydrophobe localisés à l'intérieur de la bicouche phospholipidique. La plupart d'entre elles s'étendent sur toute l'épaisseur de la bicouche (segments transmembranaires). D'autres sont ancrées à l'un ou l'autre feuillet de la bicouche par des chaînes hydrocarbonées, auxquelles elles sont reliées de façon covalente. Dans ces protéines, la chaîne polypeptidique ne pénètre pas dans la membrane. Un exemple classique de ce type d'ancre est le glycosylphosphatidylinositol (GPI), qui relie certaines protéines à la face exoplasmique de la membrane plasmique.

✓ **Les protéines membranaires périphériques, ou protéines extrinsèques :**

Elles n'interagissent pas avec le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique. Elles sont reliées à la membrane indirectement par des interactions avec des protéines intégrales, ou directement par des interactions avec les têtes polaires des lipides.

Les protéines membranaires peuvent être très abondantes au niveau de certaines membranes. Cette famille de protéines intervient dans un grand nombre de fonctions biologiques telles que la signalisation, la bioénergétique, l'adhésion et le transport de solutés.

## 2.2 Asymétrie des membranes

La membrane plasmique présente un arrangement lipidique asymétrique au niveau des feuillets qui la composent. Ainsi les phospholipides PE, PS et PI sont des composants quasi exclusifs du feuillet interne de la membrane alors que la PC, la SM et les glycosphingolipides sont enrichis sur le feuillet externe (Devaux, 1991). Grâce à l'activité de certaines protéines, appelées translocase, la diffusion de ces lipides est compensée entre les deux feuillets.

La distribution du cholestérol entre les deux feuillets des membranes est moins évidente. D'une part, le cholestérol bascule rapidement d'un feuillet à l'autre, d'autre part, il a une forte affinité pour certains lipides et protéines de la membrane. L'équilibre de sa distribution transmembranaire n'est donc pas seulement déterminé par sa capacité intrinsèque d'échange entre les feuillets de la membrane. Il est aussi défini par la répartition asymétrique des autres composants membranaires.

## 2.3 Hétérogénéité des membranes

### 2.3.1 Le concept des radeaux lipidiques

Dans le modèle de la mosaïque fluide, Singer et Nicholson envisagent la membrane cellulaire comme un fluide bidimensionnel homogène dans lequel baignent des protéines mobiles (Singer & Nicolson, 1972). Les lipides s'organisent de manière homogène sans interaction privilégiée n'ayant qu'une fonction de compartimentation et de support des

protéines. Par contre les protéines dans ce modèle, jouent un rôle majeur à la fois structurel et fonctionnel.

Au début des années 1990, ce modèle de membrane homogène a été remis en question. À partir d'expériences biochimiques de solubilisation de membranes par des détergents non ioniques, Brown et Rose ont suggéré que les lipides se regroupaient de façon préférentielle (Brown & Rose, 1992). Ce sont principalement les glycosphingolipides et le cholestérol qui grâce à leur forte affinité réciproque, sont capables de ségréger pour former des domaines lipidiques dont l'état physique se trouve dans une phase liquide plus ordonné que le reste de la membrane (Ahmed et al, 1997).

Puis Simons et Ikonen formulent l'hypothèse des rafts « radeaux lipidiques » (Simons & Ikonen, 1997). D'après leur modèle, les domaines lipidiques sont très dynamiques et sont capables de recruter ou d'exclure un ensemble spécifique de protéines. Contrairement à la mosaïque fluide, ce modèle attribue donc aux lipides un rôle fonctionnel important tel le trafic intracellulaire, la morphogénèse cellulaire et la transduction de signaux (Rajendran & Simons, 2005).

A cause de leur taille (de l'ordre de 100 nm) et de leur durée de vie (de l'ordre de 10 ms), il est très difficile d'observer directement des radeaux lipidiques sur les membranes cellulaires. Plusieurs études notamment de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FSC) et de dynamique moléculaire ont permis de montrer l'étroite connexion entre les protéines membranaires, le cytosquelette et les lipides. Mais seules les études biophysiques sur des membranes modèles ont pour l'instant permis l'observation directe de domaines lipidique en phase ordonnée sur des vésicules géantes (Baumgart et al, 2003).

### 2.3.2 Les membranes modèles mimant la membrane biologique

Plusieurs modèles membranaires sont couramment utilisés: les bicelles, les monocouches et les bicouches supportées et les vésicules. Ces dernières sont pour l'instant les modèles les plus proches des membranes biologiques.

Les vésicules unilamellaires sont des sphères composées d'une bicouche lipidique refermée sur elle même séparant un milieu aqueux intérieur d'un milieu aqueux extérieur. Leurs tailles et leurs formes peuvent être très variables. On peut les classer en trois types : les SUVs (Small Unilamellar Vesicles) de 30 à 50 nm de diamètre, les LUVs (Large Unilamellar Vesicles) de 70 à 200 nm de diamètre et les GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) de plusieurs  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les LUVs qui sont des vésicules de diamètre de 100 nm environ ont des propriétés physico-chimiques et mécaniques des membranes biologiques (en particulier des endosomes et petites vésicules de sécrétion). Elles peuvent être visualisées par microscopie électronique.

Cependant, l'extrapolation à une membrane biologique reste très délicate car :

- Les membranes biologiques sont composées de plusieurs centaines de lipides différents pouvant influencer les arrangements à la membrane.
- Elles sont riches en protéines membranaires. Qu'elles soient périphériques, transmembranaires ou ancrées au feuillet externe ou interne, les protéines peuvent par leur structure ou leur activité enzymatique modifier les propriétés de la membrane.
- Elles sont en interaction avec le cytosquelette qui forme un réseau sous membranaire et peut agir sur la compartimentation et/ou la stabilité de ces domaines.
- Elles sont constituées de deux feuillets asymétriques contrairement aux LUV et GUV qui ont une organisation symétrique des deux feuillets. Cette différence de composition lipidique des deux feuillets de la membrane influence les propriétés biophysiques membranaires.

L'arrangement lipidique le plus répandu dans les membranes biologiques est la structure lamellaire. Cette dernière est caractérisée par des membranes composées de lipides de type PC, SM, PS et PI. Selon les conditions physiologiques dans lesquelles se trouvent ces bicouches (température, composition lipidique, nature du milieu aqueux), la dynamique de ces lipides sera modifiée. Leurs propriétés mécaniques seront alors différentes suivant que les membranes se trouvent dans une phase liquide désordonnée (Ld) ou dans une phase ordonnée (Lo).

- Phase liquide désordonnée : Ld

La membrane a une épaisseur d'environ 5Å. Elle est très dépendante de la température car lorsqu'elle augmente, son épaisseur diminue. Elle est caractérisée par un arrangement de phospholipides dont les chaînes d'acides gras se trouvent à une température au dessus de leur transition de phase. La membrane a la particularité d'être très fluide grâce à une grande mobilité de chaînes carbonées.

- Phase liquide ordonnée : Lo

Elle est composée essentiellement de cholestérol et d'au moins un type de phospholipides à longues chaînes grasses saturées comme la sphingomyéline. Les stérols avec leurs cycles aromatiques très rigides ordonnent les chaînes des phospholipides. Le cholestérol a une plus forte affinité pour la sphingomyéline que pour les glycérophospholipides. Ces membranes ont la particularité d'être plus rigides.

Dans le cas d'un mélange de lipides, il est possible d'avoir une coexistence de plusieurs phases lipidiques.

### 2.3.3 Structuration membranaire grâce aux protéines

Les membranes sont considérées comme des mosaïques de domaines maintenus par le réseau du cytosquelette. La nature des lipides membranaires joue un rôle important dans la formation de ces domaines dont il existe plusieurs types. Les mieux caractérisés sont les microdomaines membranaires composés de lipides ayant des propriétés d'auto-assemblage et qui sont capables de favoriser le regroupement de protéines et la formation de complexes moléculaires. Ces microdomaines sont isolés grâce à leur caractéristique de résistance à la solubilisation par des détergents non ioniques (Triton X-100, Lubrol...), on les appelle les membranes résistantes aux détergents (DRMs).

Ces domaines, enrichis en sphingomyéline et cholestérol, sont des plateformes lipidiques permettant la ségrégation des composants membranaires à l'intérieur de la membrane cellulaire. On y trouve associées à ces domaines des protéines telles les protéines à ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol), sur la face extracellulaire, les protéines kinases de la famille Src doublement acylées et ancrées dans le feuillet cytoplasmique ou encore des protéines palmitoylées et myristoylées comme les flotillines et les cavéolines, protéines liant le cholestérol.

Des analyses de DRM par spectrométrie de masse ont montré la présence de nombreuses familles de protéines: des protéines membranaires (la cavéoline), des protéines du cytosquelette (l'actine) et des protéines de signalisation (les kinases et annexines). Nous nous intéressons plus particulièrement à certaines d'entre elles comme la cavéoline 1, l'actine et surtout l'annexine 2.

#### 2.3.3.1 **Les cavéolines**

Les cavéolines sont une famille de protéines membranaires qui sont les principales composantes de cavéoles. Les cavéoles (taille comprise entre 25 et 150 nm) sont définies comme des invaginations de la membrane plasmique impliquées notamment dans les mécanismes d'endocytose et transcytose.

Il existe trois isoformes (1, 2 et 3) qui se différencient par leur profil d'expression tissulaire. Contrairement à l'isoforme 2, les isoformes 1 et 3 présentent une bonne identité de séquence. Les cavéolines 1 et 2 sont relativement ubiquitaires mais la cavéoline 3 préférentiellement exprimée dans les cellules musculaires.

La cavéoline-1, liant fortement au cholestérol, est distribuée quasi exclusivement dans les membranes résistantes aux détergents et est utilisée comme marqueur de ces domaines. Cette propriété, ainsi que la palmitoylation multiple au niveau de la région carboxy-terminale, permettent d'expliquer la localisation des cavéoles au niveau des radeaux lipidiques.

### **2.3.3.2 L'actine**

L'actine est la protéine intracellulaire prépondérante dans la cellule eucaryote, et représente, selon les types cellulaires, de 1 à 10% de la quantité totale des protéines, pour une concentration dans le cytosol de l'ordre du millimolaire. Cette protéine de taille moyenne (375 acides aminés) est présente dans la cellule soit sous forme de monomères globulaires (actine G) soit sous forme de polymère (actine F). Le réseau d'actine est localisé d'une part juste sous la membrane plasmique, où il constitue un maillage bidimensionnel associé à la membrane, et au sein de la cellule, où il constitue un réseau tridimensionnel. Ceci lui permet de réguler la dynamique des membranes. Le cytosquelette d'actine cortical modulerait la mobilité latérale de ces membranes (DRM) et augmenterait leur stabilité.

### **2.3.3.3 Les annexines**

Les annexines appartiennent à la famille des protéines modulant leur activité en fonction de la concentration en  $Ca^{2+}$  comme la Protéine Kinase C (PKC) ou la phospholipase A2 (PLA2).

Les annexines ont été nommées ainsi du fait de leur principale propriété à annexer et maintenir ensemble certaines structures biologiques notamment les membranes. Elles fixent les lipides membranaires en présence de calcium de manière réversible. Plus de 500 gènes ont été découverts dans la famille des annexines qui englobe plus de 160 membres présents dans plus de 65 espèces incluant des protistes (Gerke & Moss, 2002). Chez les vertébrés, il existe 12 annexines.

Toutes les annexines possèdent un domaine C-terminal très conservé, le cœur, par lequel elles se lient aux membranes. La région la plus variable des annexines est le domaine N-terminal de taille variant de 1 à 361 acides aminés. Ce domaine, participe à la spécificité de chaque annexine et permet de réguler les propriétés du cœur.

De nombreuses annexines ont été isolées à partir des DRMs dont les Ax1, Ax2, Ax4, Ax5 et Ax6. (Babiyshuk & Draeger, 2000; Babiyshuk et al, 2000 ; Draeger et al, 2005). La liaison des phospholipides anioniques avec ces annexines induirait et stabiliserait la formation de ces domaines. Prenons l'exemple des cellules du muscle lisse (Babiyshuk & Draeger, 2000): lors d'une augmentation du calcium suite à un signal, l'Ax2 migre du cytosol vers la membrane au niveau des microdomaines. Celle-ci va permettre une ségrégation des lipides membranaires qui vont altérer l'organisation spatiale des récepteurs membranaires. Ainsi, les enzymes (PKC, PLA<sub>2</sub>...) sont activées et vont déclencher la signalisation (augmentation de calcium intracellulaire). Ce signal permet à l'Ax6 de migrer au sarcolemme ce qui induit la liaison entre la membrane et le cytosquelette. Enfin, c'est au tour de l'Ax5 de se fixer aux phospholipides ce qui déclenche un relâchement de la cellule musculaire.

### **3 L'Annexine 2**

L'Ax2 est une protéine cytosolique décrite pour la première fois comme le substrat de la tyrosine kinase pp60 v-Src (Erikson & Erikson, 1980). Elle est connue sous différents noms tels que p36, lipocortine 2, chaîne lourde de la calpactine, chromobindine 8, protéine I et PAP IV.

L'Ax2 est une protéine qui peut se trouver sous forme de monomère (Ax2m) de 38.5 kDa ou de tétramère (Ax2t) d'environ 100 kDa, composée de deux molécules d'Ax2 et de deux molécules de S100A10 (Johnsson et al, 1988b). Sa séquence est très conservée entre les espèces car elle présente plus de 95 % d'homologie chez les mammifères.

#### **3.1 Structure de l'Ax2**

##### **3.1.1 Ax2 monomérique**

L'Ax2, comme toutes les Annexines, est structurée en deux domaines : le cœur et le domaine N-terminal (N-ter).

**Le cœur** est composé de quatre régions homologues répétées de 70 résidus d'acides aminés. Chaque répétition est organisée en un domaine appelé aussi motif Annexine. Chaque motif est structuré en cinq hélices  $\alpha$  reliées par de courtes boucles et contenant des sites de liaison du calcium sur la face convexe de la molécule (Gerke & Moss, 2002).

La protéine a été cristallisée par plusieurs équipes mais la résolution de la structure n'a pas permis d'élucider toute la partie N-ter (Burger et al, 1996; Tran et al, 2002). Par ailleurs, il a été montré l'existence d'une interaction entre le cœur et le domaine N-ter en utilisant l'anticorps monoclonal H28 dont l'épitope se compose de résidus se situant dans ce domaine N-ter (résidus 24 à 29) et dans le cœur (résidu 65) (Johnsson et al, 1988a).

**Le domaine N-ter** est constitué de trente cinq résidus d'acides aminés. Il peut se lier à une protéine de la famille S100, la S100A10 ce qui lui permet d'adopter une conformation en hélice  $\alpha$  amphipatique.

En plus de la liaison à la protéine S100A10, dite aussi p11, (Glenney et al, 1986 ; Johnsson et al, 1988b), ce domaine lie l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)(Hajjar et al, 1998). Cette partie N-ter a la caractéristique de subir des modifications post traductionnelles telles que la phosphorylation du résidu de tyrosine 23 par la protéine kinase Src pp60 et des résidus sérine (11 et 25) par la PKC. Celle-ci permet de réguler la liaison et l'agrégation des membranes *in vitro* et par conséquent certaines propriétés et fonctions de l'Ax2. Elle peut subir une protéolyse où les premiers 31 résidus du domaine N-ter sont coupés ce qui produit une forme appelée p33 composée du cœur (32-338) et de deux acides aminés de la partie N-ter. Cette forme de protéine (p33) a été utile pour comprendre l'influence de la partie N-ter sur les propriétés du cœur (Glenney et al, 1986 ; Johnsson et al, 1988b). D'autre part, l'acétylation du premier résidu (sérine 1) est nécessaire à la formation du complexe Ax2-S100A10 de manière indépendante du calcium (Kang et al, 1997).

##### **3.1.2 Ax2 tétramérique**

L'Ax2 et la S100A10 interagissent entre elles pour former un hétérocomplexe (Ax2t) composé d'un dimère de S100A10 et de deux molécules d'Ax2.

### **3.1.2.1 La S100A10**

La S100A10 est une petite protéine cytosolique de 11 kDa de la famille des S100. Elle se lie à l'Ax2 avec une très forte affinité. Elle présente deux motifs structurés en hélice boucle hélice qui correspondraient à deux sites de liaison avec le calcium (motif "EF hand"). Cependant, par des mutations, la S100A10 ne lie plus le calcium tout en conservant la structure tridimensionnelle correspondant à une petite protéine S100 associée au calcium (Gerke & Moss, 2002).

La liaison avec l'Ax2 se fait par les résidus 1 à 14 du domaine N-ter de cette dernière (Gerke & Moss, 2002). Plusieurs résidus du domaine C-ter de la S100A10 sont importants pour cette interaction. En effet, l'alkylation du résidu cystéine 82 inhibe l'interaction entre les deux protéines (Johnsson & Weber, 1990), la modification par mutagenèse dirigée de 4 résidus hydrophobes très conservés (Tyr-85, Phe-86, Val-87, et Met-90) diminue l'affinité entre les 2 protéines (Kube et al, 1992). La S100A10 a été cristallisée avec un peptide de 14 résidus N-ter de l'Ax2 (Rety et al, 1999). Ces expériences ont permis de montrer que ce peptide s'organise en hélice  $\alpha$  et qu'il interagit avec des résidus formant une poche hydrophobe située entre 3 hélices de la S100A10 (Rety et al, 1999).

### **3.1.2.2 L'oligomérisation de l'Ax2**

Comme nous l'avons souligné, la formation du complexe (Ax2-S10A10)<sub>2</sub> se fait par la partie N-ter de l'Ax2 (résidus 1 à 14) et une poche hydrophobe de la S100A10 (Gerke & Moss, 2002). Le domaine N-ter de l'Ax2 en contact avec la S100A10 se structure en hélice  $\alpha$  amphipathique (Fig. 16) (Rety et al, 1999). La formation du complexe nécessite l'acétylation du résidu serine 1 de l'Ax2 et est indépendante du calcium (Johnsson et al, 1988b). L'interaction avec S100A10 module la propriété du cœur en baissant la quantité de calcium nécessaire à la fixation aux phospholipides (Drust & Creutz, 1988; Powell & Glenney, 1987). L'Ax2 interagit avec d'autres protéines de la famille des S100 avec moins d'affinité et nécessite la présence du calcium (S100A6, S100A4, S100A11). L'Ax2 phosphorylée (Tyr 23 ou Ser 11 et Ser 25) est capable de se lier à la S100A10 (Johnstone et al, 1992; Powell & Glenney, 1987). L'Ax2 peut aussi former des dimères de manière dépendante du calcium avec d'autres Annexines comme l'Ax1 avec une très forte affinité (Lee et al, 1999) et Ax6 lors de l'exocytose (Liu, 1999). L'Ax2 peut former un dimère en solution en présence de fortes concentrations du calcium (Ayala-Sanmartin et al, 2000b). Dans ce cas là, deux domaines N-ter des Ax2m peuvent être reliés par des ponts disulfures entre les cystéines en position 8 (Ayala-Sanmartin et al, 2004).

## **3.2 Propriétés de l'Ax2**

L'Ax2 a la capacité de se lier aux phospholipides acides membranaires de manière dépendante du calcium. Cette propriété dépend de plusieurs facteurs tels que la concentration de calcium, la composition lipidique, le pH et la salinité.

### **3.2.1 Liaison de l'Ax2 aux membranes**

#### **3.2.1.1 Liaison au calcium**

En absence de phospholipides, les 2 formes d'Ax2 (Ax2m et Ax2t) lient le calcium avec une faible affinité avec une constante de dissociation ( $K_D$ ) de l'ordre de 100 à 500  $\mu$ M. Les

motifs de liaison au calcium correspondent à la séquence consensus **Gly X Gly..38 X..D/E** (Jost et al, 1992).

En présence de phospholipides, l'affinité de l'Ax2 pour le calcium augmente. Cependant les quatre domaines répétés de la protéine ne lient pas de la même manière le calcium. En effet, le site de la liaison du motif 1 est un site de type III ayant une très faible affinité ( $K_D$  de 200  $\mu\text{M}$ ) par rapport aux motifs 2, 3 et 4 (site de liaison au calcium de type II avec un  $K_D$  de 20  $\mu\text{M}$ ). (Jost et al, 1994)

La liaison de l'Ax2 au calcium (4 sites de liaison) induit un changement de conformation du domaine cœur. L'Ax2 possède un seul tryptophane (Trp 212) situé dans l'hélice 2 du motif 3, qui a permis, par des études de fluorescence, de déterminer un changement de conformation dans le domaine 3 lors de la fixation du calcium. (Ayala-Sanmartin et al, 2004 ; Jost et al, 1992 ; Thiel et al, 1991). Ce changement de conformation de l'Ax2, ayant lieu à très forte concentration en calcium (pCa 3.5), est identique pour la forme monomérique et la forme tétramérique (Ax2t) (Pigault et al, 1990).

### **3.2.1.2 Liaison de l'Ax2 aux phospholipides**

#### *3.2.1.2.1 Liaison dépendante du calcium*

L'Ax2 lie en présence de calcium les phospholipides anioniques des membranes : phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositols (PI), acide phosphatidique (PA) et phosphatidylglycérol (PG) (Blackwood & Ernst, 1990 ; Glenney et al, 1987 ; Hayes et al, 2006).

L'interaction entre l'Ax2 et ces phospholipides est très efficace en présence d'ions calcium. Le nombre d'ions nécessaire pour l'interface phospholipide-protéine varie en fonction de l'état d'oligomérisation de la protéine et de la composition en phospholipides acides. Il a été démontré que l'Ax2 monomérique est capable de fixer 10 à 11 ions calcium tandis que le tétramère peut lier de 12 à 15 ions calcium (Evans & Nelsestuen, 1994). La liaison à la S100A10 aurait une influence sur les changements de conformation induits par le calcium et les phospholipides. Les différences observées entre le monomère et le tétramère suggèrent que des interactions particulières de la partie N-ter avec le cœur C-terminal joueraient un rôle dans l'apparition ou la disparition des sites secondaires de liaison au calcium.

Les besoins en calcium pour la liaison aux phospholipides dépendent de la composition en phospholipides acides (Powell & Glenney, 1987). En effet, la concentration en calcium pour avoir 50% de liaison aux membranes dépend de la forme de l'Ax2 (monomérique ou tétramérique) : Pour des liposomes constitués de 100% PS, elle est de 2  $\mu\text{M}$  pour le monomère et de 0,01  $\mu\text{M}$  pour le tétramère. Lorsque l'on baisse la concentration de phospholipides acides en ajoutant de la PC, comme pour des liposomes PC/PS (75/25), cette concentration en calcium est augmentée à 3  $\mu\text{M}$  pour l'Ax2m et à 0.3  $\mu\text{M}$  pour l'Ax2t (Ayala-Sanmartin et al, 2000b).

Plusieurs données sont disponibles sur l'affinité de l'Ax2 pour le calcium selon la composition lipidique des membranes. Ainsi, ces différences de concentration de calcium sont dues à la composition des membranes (pourcentage et espèces de phospholipides acides utilisés) mais aussi aux différentes techniques utilisées. D'autre part, la concentration en sels influe sur l'affinité pour les membranes et sur leur agrégation (Jones et al, 1994).

#### *3.2.1.2.2 Liaison indépendante du calcium*

En absence de calcium, l'Ax2, essentiellement sous forme tétramérique (Ax2-S100A10)<sub>2</sub> peut se lier aux liposomes contenant de la PS (Ayala-Sanmartin et al, 2001), aux granules chromaffines (Ayala-Sanmartin et al, 2001 ; Drust & Creutz, 1991), aux endosomes (Jost et al, 1997) et aux membranes de cellules alvéolaires pulmonaires (Liu, 1999). L'Ax2m se lie aux

phospholipides en absence de calcium avec une affinité plus faible mais de manière similaire. Le cholestérol régule la liaison de l'Ax2 aux membranes car on a observé une dissociation de l'Ax2 de ces membranes quand on séquestre ou extrait le cholestérol par la méthyl-beta-cyclodextrine ou la digitonine (Ayala-Sanmartin, 2001; Ayala-Sanmartin et al, 2001; Harder et al, 1997)

### *3.2.1.2.3 Liaison à pH acide*

Plusieurs annexines dont les Ax1, Ax2, Ax5, Ax6 et Ax12 ont été décrites comme interagissant avec les membranes à pH acide. Ayala-Sanmartin et ses collaborateurs ont montré que l'Ax2m se lie faiblement à des liposomes PC/PS à pH 7. Lorsque le pH est abaissé graduellement, la liaison avec les vésicules augmente et à pH 4 la totalité de la protéine est liée. De même pour le tétramère Ax2t, sa liaison avec les liposomes PS/PC augmente quand le pH diminue pour atteindre un maximum de liaison entre pH 6 et 5.5 (à pH plus acide, la S100A10 commence à se dissocier de l'Ax2) (Ayala-Sanmartin et al, 2004; Lambert et al, 2004).

## **3.2.2 Agrégation des membranes par l'Ax2**

Le phénomène d'**agrégation** consiste à former des ponts membranaires par l'Ax2.

### **3.2.2.1 Agrégation de vésicules dépendante du calcium**

L'Ax2 a la capacité, comme l'Ax1 et l'Ax6 (Glenney et al, 1987), d'agréger les membranes lipidiques. Comme pour la liaison, la capacité d'agrégation dépend de la concentration en calcium, du pH et de la composition en phospholipides acides. L'agrégation est un phénomène qui suit la liaison de l'Ax2 aux membranes suite à l'augmentation de la concentration en calcium et l'oligomérisation.

La sensibilité au calcium du monomère et du tétramère est différente : Powel et Glenney ont montré que l'agrégation de liposomes par l'Ax2t requiert moins de calcium que celle par l'Ax2m (Powell & Glenney, 1987). En effet, le cœur de la protéine seul est capable d'agréger les membranes et la région de transition N-ter/cœur a un effet régulateur (inhibiteur) sur les propriétés d'agrégation de l'Ax2m. La partie N-ter en général et les résidus 29 à 41 (séquence inhibitrice) moduleraient l'apparition d'une conformation compétente pour l'agrégation car des délétions différentes de la partie N-ter montrent une sensibilité au calcium différente (Drust & Creutz, 1988).

Comme pour la liaison, la composition lipidique des membranes influe sur la capacité d'agrégation. Le cholestérol notamment joue un rôle important en diminuant la quantité de calcium nécessaire à l'agrégation. Contrairement à la liaison, l'agrégation des membranes par l'Ax2 (tétramère et monomère) en présence de calcium induit un changement de conformation dans le cœur de la protéine (Ayala-Sanmartin et al, 2000b).

### **3.2.2.2 Agrégation de vésicules indépendantes du calcium**

En absence de calcium, l'Ax2t est capable d'agréger des liposomes. L'équipe d'Ayala-Sanmartin a montré qu'en absence de calcium, des liposomes avec 25% de PS sont agrégés par l'Ax2t à une valeur de 25% par rapport à l'agrégation en présence de calcium. Sur des liposomes à 33% de PS l'agrégation atteint 45% de l'agrégation maximale avec calcium (Ayala-Sanmartin et al, 2001).



### **3.2.2.3 Agrégation des membranes par l'Ax2 à pH acide**

L'Ax2m commence à faire agréger des liposomes PC/PS entre pH 6 et 5,5 pour atteindre son maximum à pH 4. Pour l'Ax2t, le complexe commence à agréger les membranes à pH 6,5 pour atteindre son maximum à pH 6 (Lambert et al, 2004). Concernant l'Ax2, des études de fluorescence du Tryptophane 212 ont montré que la distribution et la proportion des temps de vie de fluorescence en solution à pH 4 sont très similaires à ceux obtenus à pH 7 en présence de calcium. La protéine aurait donc la même conformation lorsqu'elle agrège des membranes à pH acide ou à pH neutre en présence du calcium. Cependant, la protéine seule à pH 4 est plus compacte que la protéine seule à pH 7 en absence de calcium (Lambert et al, 2004).

### **3.2.2.4 Modèles d'organisation de l'Ax2 lors de son agrégation aux membranes**

L'arrangement structural de l'Ax2 lors de l'agrégation aux membranes n'est toujours pas résolu. Plusieurs modèles ont été proposés selon la présence ou l'absence de calcium suite à des études notamment de cryo-microscopie électronique du complexe formant un pont membranaire avec les LUV et les granules chromaffines.

Organisation de l'Ax2 monomérique (Ax2m)
--

#### a. Agrégation de l'Ax2m en présence de calcium

En présence de calcium, l'Ax2 permet l'agrégation des liposomes (PC/PS) au niveau des jonctions entre les liposomes. Ces observations en microscopie électronique montrent deux couches de densité entre les deux bicouches lipidiques. Ces deux couches au centre de la bicouche correspondraient à deux molécules d'Ax2. (Lambert et al, 2004). Il existe deux possibilités pour que l'Ax2m agrège les membranes:

- ✓ À forte concentration en calcium, l'Ax2m se fixe à la membrane puis se dimérise.
- ✓ L'Ax2m se dimérise en solution puis à faible concentration en calcium peut se fixer à la membrane.

#### b. Agrégation de l'Ax2m à pH acide en absence de calcium

En absence de calcium à pH acide, l'Ax2 permet l'agrégation des membranes mais de manière différente qu'en présence de calcium. Lambert et ses collaborateurs ont montré par des expériences de cryo-microscopie électronique que des jonctions obtenues après agrégation des liposomes (PC/PS) montrent seulement une couche de densité électronique entre les deux bicouches lipidiques correspondant à une seule molécule d'Ax2 (Lambert et al, 2004). Ces résultats leur a permis de proposer deux modèles d'organisation de la protéine monomérique agrégeant les membranes :

- ✓ L'Ax2 monomérique fixe les deux membranes par la face convexe et concave au niveau du domaine cœur.
- ✓ L'Ax2 monomérique fixe une membrane avec son domaine cœur (face convexe) et l'autre membrane avec son domaine N-ter.

L'organisation de l'Ax2 tétramérique

a. Agrégation de l'Ax2t en présence de calcium

En présence de calcium à pH 7,4, Lambert et ses collaborateurs ont pu observer par des expériences de cryo-microscopie électronique, trois couches de protéine entre les bicouches membranaires qui pourraient correspondre à la présence du dimère S100A10 au centre du complexe entre deux molécules d'Ax2 orientées de manière opposée et en contact avec les phospholipides membranaires (Lambert et al, 1997). Deux configurations sont proposées où seule l'orientation du dimère S100A10 diffère au niveau des jonctions.

b. Agrégation de l'Ax2t à pH acide en absence de calcium

Des études sur des LUV (PC/PS) en absence de calcium à pH 6 ont montré que l'Ax2 au niveau des ponts membranaires s'organise de manière différente qu'à pH 7.4 en présence de calcium. On distingue des bandes de densité très irrégulière (Lambert et al, 2004). Les auteurs ont proposé deux modèles d'organisation du complexe lors de son agrégation à la membrane: le premier où les domaines cœur de l'Ax2t fixent chacun une membrane opposée au niveau de sa face convexe et le second où les domaines cœur de l'Ax2t fixent la même membrane.

**3.2.2.5 Liaison avec le cytosquelette**

Certaines Annexines sont appelées également 'Calpactines' (« protein binding calcium Phospholipid and actin ») grâce à leurs propriétés de lier les filaments d'actine (Glenney et al, 1987). L'Ax2 est la première Annexine à avoir été décrite comme interagissant et empaquetant les filaments d'actine (Glenney et al, 1987). L'interaction de l'Ax2 avec l'actine se fait par le domaine C-ter de l'Ax2 par l'intermédiaire du motif 'LLYLCGGDD' qui constitue les derniers acides aminés de la séquence (Filipenko & Waisman, 2001). Le domaine 'VLIRMVSR', se situant dans le motif 4 de l'Ax2, semble jouer un rôle dans l'empaquetage des filaments d'actine (Jones et al, 1992).

**3.3 Fonctions de l'Ax2**

3.3.1 Rôle de l'Ax2 dans le trafic intracellulaire

L'Ax2 a été localisée à la membrane plasmique (Nakata et al, 1990; Senda et al, 1994), au niveau des endosomes (Emans et al, 1993; Harder & Gerke, 1993) et dans les granules de sécrétion de cellules de chromaffines (Creutz et al, 1983).

L'Ax2 est impliquée dans le processus d'exocytose. En effet, il a été montré qu'elle agrège les granules de chromaffines en présence de calcium ce qui permettrait la fusion membranaires de ces granules en présence d'acide arachidonique (Drust & Creutz, 1988). L'inhibition de l'expression de l'Ax2 avec un ARN inhibiteur (ARNi) bloque la voie d'exocytose dans des cellules endothéliales (Knop et al, 2004). Cette activité de l'Ax2 dans l'exocytose est régulée par la phosphorylation de la sérine 25 par la PKC (Chasserot-Golaz et al, 1996).

L'Ax2 est aussi impliquée dans l'endocytose en s'associant aux vésicules de manière indépendante du calcium (Harder et al, 1997 ; Jost et al, 1997). En effet, l'Ax2 a été localisée sur de nombreuses vésicules telles que les vésicules de l'endosome de tri et recyclage (Trischler et al, 1999) et vésicules de l'endosomes précoce (Emans et al, 1993), mais n'est pas présente sur les vésicules de l'endosome tardif (Trischler et al, 1999). L'Ax2m est associée aux vésicules d'endocytose (la S100A10 n'étant pas indispensable à ce phénomène) de manière dépendante du

pH (compartiment acide) et indépendante du calcium (Morel & Gruenberg, 2009). Aussi, l'Ax2 intervient dans différentes étapes de l'endocytose où elle joue un rôle dans le transport de l'endosome précoce vers l'endosome tardif et dans la liaison des vésicules endosomales aux filaments d'actine (Morel et al, 2009). Par ailleurs, il a été montré que la phosphorylation de l'Ax2 sur la tyrosine 23 régule le trafic des vésicules endosomales en provoquant sa relocalisation sur les vésicules endosomales positives pour rab14, petite protéine GTPase ayant un rôle dans le recyclage endosomal et le transport Golgi/ endosome (Hayes & Moss, 2009; Morel & Gruenberg, 2009).

L'Ax2 est aussi impliquée dans le transport de vésicules issu du réseau trans-Golgien, les vésicules SAVs ("sucrase isomaltase carrying apical vesicle") riches en microdomaines de type radeaux lipidiques. Contrairement à l'endocytose, la protéine S100A10 est nécessaire à cette fonction (Jacob et al, 2004). D'autre part, l'Ax2 est impliquée dans le transport vers la membrane plasmique de plusieurs canaux ioniques (van de Graaf et al, 2003).

### 3.3.2 Rôle de l'Ax2 dans la formation et la stabilisation des microdomaines membranaires

L'Ax2 sous forme tétramérique ou monomérique ségrégerait latéralement certains phospholipides anioniques comme la phosphatidylsérine (PS) (Menke et al, 2005) et le phosphatidylinositol (Gokhale et al, 2005) pour former les microdomaines lipidiques. Ces domaines, induits par l'Ax2 en présence de calcium, sont nécessaires pour l'organisation spatiale et structurale du phénomène d'exocytose (Chasserot-Golaz et al, 2005). De même, l'Ax2 stabiliserait les microdomaines contenant le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP2) à la membrane plasmique en recrutant les protéines qui fixe le PIP2 pour agir dans le processus d'exocytose. Enfin, le cytosquelette d'actine cortical modulerait la mobilité latérale de ces microdomaines et augmenterait leur stabilité. Ainsi, la formation de l'Ax2t à la membrane plasmique permettrait la formation du complexe membrane-cytosquelette d'actine qui contrôlerait l'assemblage de ces membranes de type radeaux.

### 3.3.3 Rôle de l'Ax2 dans la régulation des interactions avec le cytosquelette

La polymérisation de l'actine est impliquée dans la plupart des processus biologiques des cellules eucaryotes. Les filaments d'actine sont associés aux points de contact entre les cellules (jonctions adhérentes), dans les points d'adhésion focaux qui permettent l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire. Ils sont en constant remodelage et réarrangements dynamiques. Ce mouvement des filaments d'actine est associé à plusieurs événements cellulaires tels que la phagocytose, la pinocytose, la migration, la formation de filopodes et lamellipodes, l'endocytose, l'exocytose et la différenciation cellulaire.

L'Ax2 est un composant des compartiments cellulaires impliqués dans ces événements biologiques car son interaction directe avec l'actine (comme nous l'avons vu précédemment) laisse penser qu'elle pourrait avoir un rôle dans la régulation de la dynamique du cytosquelette. Il a été montré par des expériences de FRET que l'Ax2 colocalise avec l'actine au niveau de la membrane plasmique, où l'actine est organisée en filaments appelés filaments corticaux (Hayes et al, 2006). De plus, qu'elle régule la dynamique du cytosquelette d'actine et inhibe la polymérisation des filaments d'actine de manière dépendante du calcium (Hayes et al, 2006).

L'Ax2 interagit de deux manières avec les filaments d'actine à la membrane plasmique : soit de manière directe (Hayes et al, 2006) soit de manière indirecte via la protéine AHNAK.

La protéine AHNAK (dite aussi desmoyokine), est une protéine géante (700 kDa) phosphorylée du desmosome jouant un rôle dans le maintien et l'organisation de la membrane plasmique (Benaud et al, 2004). Dans les cellules épithéliales, la protéine AHNAK est présente

principalement dans le cytoplasme quand les cellules sont à faible concentration de calcium puis elle se déplace vers la membrane plasmique lors d'une augmentation de la concentration extracellulaire de calcium ou après activation de la protéine kinase C. Il a été mis en évidence que l'Ax2t sert de liaison entre le cytosquelette et la protéine AHNAK. L'Ax2t recruterait AHNAK à la membrane plasmique au niveau des microdomaines. Ce recrutement semble essentiel pour l'établissement de la cytoarchitecture dans les cellules épithéliales polarisées (Benaud et al, 2004; De Seranno et al, 2006). C'est la fixation de la S100A10 qui stimule l'interaction avec AHNAK cependant la formation du tétramère est nécessaire pour que leur interaction soit efficace. En effet, l'Ax2 induirait un changement de conformation de la S100A10 qui augmenterait son affinité pour la protéine AHNAK. Cette liaison se fait au niveau de deux sites, le premier situé sur la partie N-ter de AHNAK et ayant une très forte affinité avec l'Ax2t et le second dont l'affinité est plus faible se situe sur la partie C-ter de AHNAK (De Seranno et al, 2006).

Cependant, l'Ax2m sert de lien direct entre le cytosquelette d'actine corticale et des domaines membranaires riches en phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) (Hayes & Moss, 2009).

Enfin, l'interaction entre l'Ax2 et l'actine joue aussi un rôle dans l'endocytose au niveau du transport des vésicules endosomales (Hayes & Moss, 2009) et de la formation des corps multivésiculaires de l'endosome tardif (Morel et al, 2009).

### 3.3.4 Rôle de l'Ax2 dans la mise en place des jonctions cellulaires

L'analyse différentielle des fractions membranaires de cellules épithéliales a montré que l'Ax2 et la S100A10 sont associées à la membrane latérale et colocalisent avec la cadhérine au niveau des jonctions adhérentes quand les cellules sont polarisées (Yamada et al, 2006 ; Yamada et al, 2005). Le complexe Ax2-S100A10 est cytosolique dans les cellules épithéliales isolées non différenciées. Au cours de la différenciation, ce complexe s'associe à la membrane plasmique via des phospholipides anioniques et d'autres protéines (Gerke et al, 2005). Ainsi ce complexe semble jouer un rôle important dans la formation des jonctions de manière dépendante du calcium. De même, dans les cellules endothéliales, l'Ax2 est un composant majeur des complexes jonctionnels nécessaires à la formation d'un endothélium. L'Ax2 est la seule protéine de la famille des annexines présente dans ces complexes (Heyraud et al, 2008).

L'Ax2 est essentielle pour la formation des jonctions adhérentes mais pas pour les jonctions serrées. En effet, l'extinction de l'expression de l'Ax2 par ARNi dans les cellules épithéliales et endothéliales, empêche la formation des jonctions adhérentes et la localisation de la E-cadhérine à la membrane mais n'empêche pas la formation des jonctions serrées. De plus, la formation et le maintien des jonctions serrées dépendent de la mise en place des jonctions adhérentes. Lors de l'inhibition de l'Ax2, la formation des jonctions serrées est régulée par les nectines et l'afadine (Yamada et al, 2006).

### 3.3.5 Fonctions extracellulaires

L'Ax2 a été décrite comme une protéine extracellulaire fixant plusieurs ligands et comme point d'ancrage de ces ligands à la surface membranaire.

L'Ax2 a un rôle important dans la cascade d'activation du plasminogène à la surface des cellules endothéliales (Hajjar & Krishnan, 1999). L'Ax2 lie le plasminogène et le tPA (tissue Plasminogen Activator). L'interaction de l'Ax2 avec le tPA se fait par les résidus 7 et 12 de la partie N-ter qui contient un résidu cystéine en position 8. La dérivation de cette cystéine en homocystéine réduit l'interaction avec le tPA (Hajjar et al, 1998). L'Ax2 régule le taux de

plasminogène et joue un rôle crucial dans la dégradation de la fibrine et ainsi dans le maintien de l'homéostasie fibrinolytique.

***Références***  
***bibliographiques***

- Ahmed SN, Brown DA, London E (1997)** On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 36: 10944-10953
- Ayala-Sanmartin J (2001)** Cholesterol enhances phospholipid binding and aggregation of annexins by their core domain. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 72-79
- Ayala-Sanmartin J, Cavusoglu N, Masliah J, Trugnan G (2004)** Homodimerization of Annexin 2. Role of the N-terminal tail and modulation of membrane aggregation properties. *Annexins* 1: 19-25
- Ayala-Sanmartin J, Gouache P, Henry JP (2000a)** N-Terminal domain of annexin 2 regulates Ca(2+)-dependent membrane aggregation by the core domain: a site directed mutagenesis study. *Biochemistry* 39: 15190-15198
- Ayala-Sanmartin J, Henry JP, Pradel LA (2001)** Cholesterol regulates membrane binding and aggregation by annexin 2 at submicromolar Ca(2+) concentration. *Biochim Biophys Acta* 1510: 18-28
- Ayala-Sanmartin J, Vincent M, Sopkova J, Gallay J (2000b)** Modulation by Ca(2+) and by membrane binding of the dynamics of domain III of annexin 2 (p36) and the annexin 2-p11 complex (p90): implications for their biochemical properties. *Biochemistry* 39: 15179-15189
- Babiychuk EB, Draeger A (2000)** Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* 150: 1113-1124
- Babiychuk VS, Draeger A, Babiychuk EB (2000)** Smooth muscle actomyosin promotes Ca2+-dependent interactions between annexin VI and detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains. *Acta Biochim Pol* 47: 579-589
- Bagatolli LA (2006)** To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1541-1556
- Baumgart T, Hess ST, Webb WW (2003)** Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature* 425: 821-824
- Benaud C, Gentil BJ, Assard N, Court M, Garin J, Delphin C, Baudier J (2004)** AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J Cell Biol* 164: 133-144
- Blackwood RA, Ernst JD (1990)** Characterization of Ca2(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. *Biochem J* 266: 195-200
- Brown DA, Rose JK (1992)** Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-544
- Burger A, Berendes R, Liemann S, Benz J, Hofmann A, Gottig P, Huber R, Gerke V, Thiel C, Romisch J, Weber K (1996)** The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. *J Mol Biol* 257: 839-847
- Chasserot-Golaz S, Vitale N, Sagot I, Delouche B, Dirrig S, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF (1996)** Annexin II in exocytosis: catecholamine secretion requires the translocation of p36 to the subplasmalemmal region in chromaffin cells. *J Cell Biol* 133: 1217-1236

- Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader MF (2005)** Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 16: 1108-1119
- Chichili GR, Rodgers W (2009)** Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci* 66: 2319-2328
- Creutz CE, Dowling LG, Sando JJ, Villar-Palasi C, Whipple JH, Zaks WJ (1983)** Characterization of the chromobindins. Soluble proteins that bind to the chromaffin granule membrane in the presence of Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* 258: 14664-14674
- De Seranno S, Benaud C, Assard N, Khediri S, Gerke V, Baudier J, Delphin C (2006)** Identification of an AHNAK binding motif specific for the Annexin2/S100A10 tetramer. *J Biol Chem* 281: 35030-35038
- Devaux PF (1991)** Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30: 1163-1173
- Devaux PF, Morris R (2004)** Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic* 5: 241-246
- Draeger A, Wray S, Babiychuk EB (2005)** Domain architecture of the smooth-muscle plasma membrane: regulation by annexins. *Biochem J* 387: 309-314
- Drust DS, Creutz CE (1988)** Aggregation of chromaffin granules by calpactin at micromolar levels of calcium. *Nature* 331: 88-91
- Drust DS, Creutz CE (1991)** Differential subcellular distribution of p36 (the heavy chain of calpactin I) and other annexins in the adrenal medulla. *J Neurochem* 56: 469-478
- Edidin M (2003)** Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 414-418
- Emans N, Gorvel JP, Walter C, Gerke V, Kellner R, Griffiths G, Gruenberg J (1993)** Annexin II is a major component of fusogenic endosomal vesicles. *J Cell Biol* 120: 1357-1369
- Erikson E, Erikson RL (1980)** Identification of a cellular protein substrate phosphorylated by the avian sarcoma virus-transforming gene product. *Cell* 21: 829-836
- Evans TC, Jr., Nelsestuen GL (1994)** Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric annexin II. *Biochemistry* 33: 13231-13238
- Evans WH (1979)** Preparation and Characterisation of Mammalian Plasma Membranes Amsterdam: North- Holland.
- Filipenko NR, Waisman DM (2001)** The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem* 276: 5310-5315
- Gates J, Peifer M (2005)** Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell* 123: 769-772
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE (2005)** Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 449-461
- Gerke V, Moss SE (2002)** Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82: 331-371



- Glenney JR, Jr., Boudreau M, Galyean R, Hunter T, Tack B (1986)** Association of the S-100-related calpactin I light chain with the NH<sub>2</sub>-terminal tail of the 36-kDa heavy chain. *J Biol Chem* 261: 10485-10488
- Glenney JR, Jr., Tack B, Powell MA (1987)** Calpactins: two distinct Ca<sup>++</sup>-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. *J Cell Biol* 104: 503-511
- Gobom J, Nordhoff E, Mirgorodskaya E, Ekman R, Roepstorff P (1999)** Sample purification and preparation technique based on nano-scale reversed-phase columns for the sensitive analysis of complex peptide mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 34: 105-116
- Gokhale NA, Abraham A, Digman MA, Gratton E, Cho W (2005)** Phosphoinositide specificity of and mechanism of lipid domain formation by annexin A2-p11 heterotetramer. *J Biol Chem* 280: 42831-42840
- Hajjar KA, Krishnan S (1999)** Annexin II: a mediator of the plasmin/plasminogen activator system. *Trends Cardiovasc Med* 9: 128-138
- Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT, Zhong F, Mirza UA, Padovan JC, Chait BT (1998)** Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem* 273: 9987-9993
- Harder T, Gerke V (1993)** The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin II<sub>2</sub>p11(2) complex. *J Cell Biol* 123: 1119-1132
- Harder T, Kellner R, Parton RG, Gruenberg J (1997)** Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 8: 533-545
- Harder T, Simons K (1997)** Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9: 534-542
- Hayes MJ, Merrifield CJ, Shao D, Ayala-Sanmartin J, Schorey CD, Levine TP, Proust J, Curran J, Bailly M, Moss SE (2004a)** Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem* 279: 14157-14164
- Hayes MJ, Moss SE (2009)** Annexin 2 Has a Dual Role as Regulator and Effector of v-Src in Cell Transformation. *J Biol Chem* 284: 10202-10210
- Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE (2004b)** Annexin-actin interactions. *Traffic* 5: 571-576
- Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE (2006)** Regulation of actin dynamics by annexin 2. *Embo J* 25: 1816-1826
- Heyraud S, Jaquinod M, Durmort C, Dambroise E, Concord E, Schaal JP, Huber P, Gulino-Debrac D (2008)** Contribution of annexin 2 to the architecture of mature endothelial adherens junctions. *Mol Cell Biol* 28: 1657-1668
- Jacob R, Heine M, Eikemeyer J, Frerker N, Zimmer KP, Rescher U, Gerke V, Naim HY (2004)** Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 279: 3680-3684
- Johnsson N, Johnsson K, Weber K (1988a)** A discontinuous epitope on p36, the major substrate of src tyrosine-protein-kinase, brings the phosphorylation site into the neighbourhood of a consensus sequence for Ca<sup>2+</sup>/lipid-binding proteins. *FEBS Lett* 236: 201-204

- Johnsson N, Marriott G, Weber K (1988b)** p36, the major cytoplasmic substrate of src tyrosine protein kinase, binds to its p11 regulatory subunit via a short amino-terminal amphiphatic helix. *Embo J* 7: 2435-2442
- Johnsson N, Weber K (1990)** Alkylation of cysteine 82 of p11 abolishes the complex formation with the tyrosine-protein kinase substrate p36 (annexin 2, calpactin 1, lipocortin 2). *J Biol Chem* 265: 14464-14468
- Johnstone SA, Hubaishy I, Waisman DM (1992)** Phosphorylation of annexin II tetramer by protein kinase C inhibits aggregation of lipid vesicles by the protein. *J Biol Chem* 267: 25976-25981
- Jones PG, Fitzpatrick S, Waisman DM (1994)** Chromaffin granules release calcium on contact with annexin VI: implications for exocytosis. *Biochemistry* 33: 8180-8187
- Jones PG, Moore GJ, Waisman DM (1992)** A nonapeptide to the putative F-actin binding site of annexin-II tetramer inhibits its calcium-dependent activation of actin filament bundling. *J Biol Chem* 267: 13993-13997
- Jost M, Thiel C, Weber K, Gerke V (1992)** Mapping of three unique Ca(2+)-binding sites in human annexin II. *Eur J Biochem* 207: 923-930
- Jost M, Weber K, Gerke V (1994)** Annexin II contains two types of Ca(2+)-binding sites. *Biochem J* 298 Pt 3: 553-559
- Jost M, Zeuschner D, Seemann J, Weber K, Gerke V (1997)** Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca<sup>2+</sup> is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J Cell Sci* 110 ( Pt 2): 221-228
- Kang HM, Kassam G, Jarvis SE, Fitzpatrick SL, Waisman DM (1997)** Characterization of human recombinant annexin II tetramer purified from bacteria: role of N-terminal acetylation. *Biochemistry* 36: 2041-2050
- Knop M, Aareskjold E, Bode G, Gerke V (2004)** Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *Embo J* 23: 2982-2992
- Kobayashi T, Beuchat MH, Chevallier J, Makino A, Mayran N, Escola JM, Lebrand C, Cosson P, Kobayashi T, Gruenberg J (2002)** Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem* 277: 32157-32164
- Kube E, Becker T, Weber K, Gerke V (1992)** Protein-protein interaction studied by site-directed mutagenesis. Characterization of the annexin II-binding site on p11, a member of the S100 protein family. *J Biol Chem* 267: 14175-14182
- Lambert O, Cavusoglu N, Gallay J, Vincent M, Rigaud JL, Henry JP, Ayala-Sanmartin J (2004)** Novel organization and properties of annexin 2-membrane complexes. *J Biol Chem* 279: 10872-10882
- Lambert O, Gerke V, Bader MF, Porte F, Brisson A (1997)** Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 272: 42-55
- Lee KH, Na DS, Kim JW (1999)** Calcium-dependent interaction of annexin I with annexin II and mapping of the interaction sites. *FEBS Lett* 442: 143-146
- Liu L (1999)** Calcium-dependent self-association of annexin II: a possible implication in exocytosis. *Cell Signal* 11: 317-324

- Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V, Mostov K (2007)** PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* 128: 383-397
- Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS (2005)** Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 17: 453-458
- Menke M, Gerke V, Steinem C (2005)** Phosphatidylserine membrane domain clustering induced by annexin A2/S100A10 heterotetramer. *Biochemistry* 44: 15296-15303
- Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A (2009)** The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cell Mol Life Sci* 66: 2623-2642
- Monastyrskaya K, Tschumi F, Babiychuk EB, Stroka D, Draeger A (2008)** Annexins sense changes in intracellular pH during hypoxia. *Biochem J* 409: 65-75
- Morel E, Gruenberg J (2009)** Annexin A2 binding to endosomes and functions in endosomal transport are regulated by tyrosine 23 phosphorylation. *J Biol Chem* 284: 1604-1611
- Morel E, Parton RG, Gruenberg J (2009)** Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell* 16: 445-457
- Nakata T, Sobue K, Hirokawa N (1990)** Conformational change and localization of calpactin I complex involved in exocytosis as revealed by quick-freeze, deep-etch electron microscopy and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 110: 13-25
- Nelson WJ, Veshnock PJ (1987)** Modulation of fodrin (membrane skeleton) stability by cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Cell Biol* 104: 1527-1537
- Obaid AL, Loew LM, Wuskell JP, Salzberg BM (2004)** Novel naphthylstyryl-pyridium potentiometric dyes offer advantages for neural network analysis. *J Neurosci Methods* 134: 179-190
- Ooshio T, Irie K, Morimoto K, Fukuhara A, Imai T, Takai Y (2004)** Involvement of LMO7 in the association of two cell-cell adhesion molecules, nectin and E-cadherin, through afadin and alpha-actinin in epithelial cells. *J Biol Chem* 279: 31365-31373
- Pettitt TR, Dove SK, Lubben A, Calaminus SD, Wakelam MJ (2006)** Analysis of intact phosphoinositides in biological samples. *J Lipid Res* 47: 1588-1596
- Pigault C, Follenius-Wund A, Lux B, Gerard D (1990)** A fluorescence spectroscopy study of the calpactin I complex and its subunits p11 and p36: calcium-dependent conformation changes. *Biochim Biophys Acta* 1037: 106-114
- Powell MA, Glenney JR (1987)** Regulation of calpactin I phospholipid binding by calpactin I light-chain binding and phosphorylation by p60v-src. *Biochem J* 247: 321-328
- Pujuguet P, Del Maestro L, Gautreau A, Louvard D, Arpin M (2003)** Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell* 14: 2181-2191
- Rajendran L, Simons K (2005)** Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118: 1099-1102
- Rescher U, Gerke V (2008)** S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Arch* 455: 575-582

- Rescher U, Ruhe D, Ludwig C, Zobiack N, Gerke V (2004)** Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci* 117: 3473-3480
- Rety S, Sopkova J, Renouard M, Osterloh D, Gerke V, Tabaries S, Russo-Marie F, Lewit-Bentley A (1999)** The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol* 6: 89-95
- Sarafian T, Pradel LA, Henry JP, Aunis D, Bader MF (1991)** The participation of annexin II (calpactin I) in calcium-evoked exocytosis requires protein kinase C. *J Cell Biol* 114: 1135-1147
- Senda T, Okabe T, Matsuda M, Fujita H (1994)** Quick-freeze, deep-etch visualization of exocytosis in anterior pituitary secretory cells: localization and possible roles of actin and annexin II. *Cell Tissue Res* 277: 51-60
- Shao C, Zhang F, Kemp MM, Linhardt RJ, Waisman DM, Head JF, Seaton BA (2006)** Crystallographic analysis of calcium-dependent heparin binding to annexin A2. *J Biol Chem* 281: 31689-31695
- Simons K, Ikonen E (1997)** Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572
- Simons K, van Meer G (1988)** Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27: 6197-6202
- Singer SJ, Nicolson GL (1972)** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731
- Smart EJ, De Rose RA, Farber SA (2004)** Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3450-3455
- Sopkova-de Oliveira Santos J, Oling FK, Rety S, Brisson A, Smith JC, Lewit-Bentley A (2000)** S100 protein-annexin interactions: a model of the (Anx2-p11)<sub>2</sub> heterotetramer complex. *Biochim Biophys Acta* 1498: 181-191
- Thiel C, Weber K, Gerke V (1991)** Characterization of a Ca<sup>2+</sup>-binding site in human annexin II by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 266: 14732-14739
- Tran JT, Rosengarth A, Luecke H (2002)** Cloning, purification and crystallization of full-length human annexin 2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 1854-1857
- Trischler M, Stoorvogel W, Ullrich O (1999)** Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway. *J Cell Sci* 112 ( Pt 24): 4773-4783
- van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D, Lamers D, Prenen J, Rescher U, Gerke V, Staub O, Nilius B, Bindels RJ (2003)** Functional expression of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *Embo J* 22: 1478-1487
- van Meer G (2005)** Cellular lipidomics. *Embo J* 24: 3159-3165
- Yamada A, Fujita N, Sato T, Okamoto R, Ooshio T, Hirota T, Morimoto K, Irie K, Takai Y (2006)** Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells. *Oncogene* 25: 5085-5102
- Yamada A, Irie K, Hirota T, Ooshio T, Fukuhara A, Takai Y (2005)** Involvement of the annexin II-S100A10 complex in the formation of E-cadherin-based adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 280: 6016-6027.