



**HAL**  
open science

# Approche biophysique de l'étude de l'insertion du domaine de translocation de la toxine botulique dans les membranes

Caroline Montagner

► **To cite this version:**

Caroline Montagner. Approche biophysique de l'étude de l'insertion du domaine de translocation de la toxine botulique dans les membranes. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00264440

**HAL Id: tel-00264440**

**<https://theses.hal.science/tel-00264440>**

Submitted on 17 Mar 2008

**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 Joseph Fourier, Grenoble 1

Spécialité  
**Biologie Structurale et Nanobiologie**

Présentée par M<sup>elle</sup> **Caroline MONTAGNER**

En vue de l'obtention du grade de **Docteur de l'Université Joseph Fourier  
Grenoble 1**

Sujet de la thèse

Approche biophysique de l'étude de l'insertion du domaine  
de translocation de la toxine botulique dans les membranes

Soutenue le 17 Décembre 2007

Composition du jury :

**Dr. Daniel LADANT**  
**Dr. Bruno BEAUMELLE**  
**Dr. Claire DANE**  
**Dr. Eric FOREST**  
**Dr. Daniel GILLET**  
**Dr. Serge PEREZ**  
**Dr. Florent GUILLAIN**  
**Dr. Vincent FORGE**

Rapporteur  
Rapporteur  
Invitée à participer au jury  
Invité à participer au jury  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Directeur de thèse

**LABORATOIRE DE CHIMIE ET BIOLOGIE DES METAUX UMR 5249**  
Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant  
Commissariat à l'Energie Atomique CEA-Grenoble



## Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (anciennement Biophysique Moléculaire et Cellulaire) au CEA-Grenoble dirigé par le Professeur Marc Fontecave. Je tiens à remercier le Docteur Florent GUILLAIN pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire (BMC) ainsi que le Professeur Marc Fontecave qui dirige actuellement le LCBM dans lequel s'est intégré le BMC.

Je remercie tout particulièrement les Docteur Bruno BEAUMELLE et Daniel LADANT qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs du présent manuscrit et de toute l'attention qu'ils ont portée à sa lecture.

Je remercie également Serge PEREZ, Daniel GILLET, Eric FOREST et Claire DANE qui ont accepté d'être membre du jury.

Ce travail de thèse a pu être réalisé grâce à la Délégation Générale à l'Armement qui m'a octroyé une bourse de thèse pour ces 3 ans. A ce titre, je remercie les Docteurs Christine COUESNON, Claire DANE.

Ce travail n'aurait pu être accompli sans l'attention et les discussions avec Vincent FORGE. Il en fallait du courage pour me laisser faire mes propres erreurs, de la confiance pour accepter toutes ces idées un peu folles et de la patience aussi pour canaliser cette ébullition permanente d'idées et de théories parfois saugrenues ; il faut bien le reconnaître. Par-dessus tout, merci de m'avoir aidée à « grandir » dans ce microcosme et m'en avoir appris le langage et les codes.

Bien évidemment, je n'oublie pas mes collègues de bureau, ceux-là mêmes qui ont partagé mes joies et mes peines au quotidien et qui pour sur, n'oublieront pas quelques-unes des expressions toulousaines qui auraient pu m'échapper alors. Avec une pensée toute particulière pour Serge CROUZY qui a toujours trouvé le temps pour me prêter une oreille attentive que les propos soient scientifiques ou non.

On ne le dira jamais assez, « faire de la science » est un travail d'équipe où tout un chacun apporte sa pierre à l'édifice. Ce projet de thèse n'échappe pas à la règle. Aussi serait-il injuste de ne pas citer ici Stéphanie RAFFESTIN, Marie GALLOUX et Heidi VITRAC dont l'énergie et les compétences ont permis de faire avancer le projet très rapidement. Toujours de bon conseil et disponibles, auprès de qui j'ai beaucoup appris.

A Grégory VERNIER qui m'a appris les secrets des LUVS et autres SUVs, merci.

A Alexandre CHENAL pour son enthousiasme des plus communicatifs, pour ses conseils expérimentaux, pour tout le temps qu'il m'a consacré, toute ma gratitude.

Et puis il y a tout ceux-là, toujours présents, que le soleil brille ou qu'il pleuve. Toujours prêts à tendre une main secourable, capable de tout entendre, même (et surtout) le silence (mes silences). Mes amis sans le soutien desquels, ce travail ne serait sans doute jamais arrivé à son terme. Ceux-là même qui m'ont remercié de tant de choses alors qu'à la vérité la seule chose jamais accomplie n'a été que de les aimer. Simple logique étymologique. Qu'ils soient assurés de mon indéfectible amitié.

Il faut rencontrer un jour ses amis, et quoi de mieux pour faire connaissance qu'une association de doctorants lorsqu'on est nouveau venu en ville ? « AITAP, une étape dans ta vie. » La boutade n'aura jamais été plus vraie.

Enfin, les derniers mais pas des moindres, ceux sans qui rien de tout cela n'aurait été possible : ma famille. MERCI...



## Liste des Abréviations

**aMb** : apomyoglobine  
**ANTP** : Associated Non Toxic Proteins  
**BAR** : Bin/Amphiphysine/Rvs  
**BoNT/x** : Neurotoxine Botulique de type x  
**C+T** : Domaines Catalytique et de Translocation de la toxine botulique  
**C8FTAC** : Surfactant fluoré  
**CD** : Circular Dichroism (Dichroïsme Circulaire)  
**Ci/NaCi** : Acide citrique/Citrate de Sodium  
**Cmc** : Concentration Micellaire Critique  
**Dansyl-DHPE** : N-(5-diméthylaminonaphthalene-1-sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triéthylammonium salt  
**DMPC** : Dimyristoyl phosphatidylcholine  
**DT** : Domaine de translocation de la toxine diphtérique  
**EPA** : Acide phosphatidique de l'oeuf  
**EPC** : Phosphatidylcholine de l'oeuf  
**ESI** : Electrospray Ionization  
**FRET** : Förster Resonance Energy Transfer  
**HA** : Protéines aux propriétés Hémagglutinantes  
**H/D** : Hydrogène/Deutérium  
 **$\lambda_{max}$**  : Longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence  
**L/P** : Lipides/Protéines  
**LUV** : Large Unilamellar Vesicle  
**MALDI-TOF** : Matrix Assited Laser Desorption Ionization-Time Of Flight  
**MLV**: MultiLamellar Vesicle  
**NaP**:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
**NSF** : N-éthylmaleimide Sensitive Factor  
**PC** : Phosphatidyl choline  
**PE** : Phosphatidyl éthanolamine  
**PI** : Phosphatidyl Inositol  
**PS** : Phosphatidyl sérine  
**S**: Coefficient de Sveberg  
**SNAP** : Soluble NSF Attachment Protein  
**SNARE** : Soluble NSF Associated Protein Receptor  
**SUV** : Small Unilamellar Vesicle  
**syti/II** : Synaptotagmine I/II  
**VAMP** : Vesicle Associated Membrane Protein  
**[ $\theta$ ]** : ellipticité molaire moyenne par résidu  
**(9-10Br)-PC** : 1-Palmitoyl-2-Stearoyl(9-10)dibromo-sn-Glycero-3-Phosphocholine



# TABLE DES MATIERES (CONDENSEE)

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION .....</b>   | <b>16</b> |
| PREAMBULE.....  | 18        |
| <b>A - LA TOXINE BOTULIQUE.....</b>   | <b>21</b> |
| <i>I - Historique du botulisme.....</i>   | <i>21</i> |
| <i>II - Les Clostridium.....</i>  | <i>21</i> |
| <i>III - Modes de contamination du botulisme et formes cliniques.....</i>   | <i>23</i> |
| III.1 - Modes de contamination.....   | 23        |
| III.2 - Le botulisme humain.....  | 24        |
| III.3 - Le botulisme chez l'animal.....   | 24        |
| <i>IV - Les complexes botuliques.....</i>   | <i>25</i> |
| IV.1 - Composition.....   | 25        |
| IV.2 - Passage de la barrière intestinale.....  | 26        |
| <i>V - La toxine botulique.....</i>   | <i>27</i> |
| <i>VI - Mode d'action de la toxine botulique.....</i>   | <i>29</i> |
| VI.1 - Liaison de la toxine botulique à son récepteur.....  | 29        |
| VI.2 - Internalisation et trafic intracellulaire de la toxine botulique.....  | 31        |
| VI.3 - Activité enzymatique de la chaîne légère.....  | 34        |
| VI.4 - Le domaine de translocation de la toxine botulique.....  | 37        |
| <b>B - LES MEMBRANES BIOLOGIQUES .....</b>  | <b>39</b> |
| <i>I - Le modèle de la mosaïque fluide.....</i>   | <i>39</i> |
| <i>II - Les interactions protéines-lipides.....</i>   | <i>41</i> |
| II.1 - Les différents modes d'association des protéines aux membranes.....  | 41        |
| II.2 - Les protéines intrinsèques.....  | 42        |
| II.3 - Les protéines membranaires transitoires : Amphitropisme.....   | 43        |
| <i>III - Les lipides.....</i>   | <i>45</i> |
| III.1 - Les acides gras.....  | 46        |
| III.2 - Les phospholipides.....   | 48        |
| III.3 - Les diacylphosphoglycérides.....  | 48        |
| III.4 - Les sphingolipides.....   | 48        |
| III.5 - Les stéroïdes.....  | 49        |
| <i>IV - Polymorphisme physique des lipides dans l'eau.....</i>  | <i>49</i> |
| IV.1 - Diagramme de phase lipide-eau.....   | 50        |
| IV.2 - Concentration micellaire critique (cmc).....   | 50        |
| IV.3 - Cas des lipides bicaténaires.....  | 51        |
| <i>V - La membrane.....</i>   | <i>52</i> |
| V.1 - Mouvements des lipides au sein de la membrane.....  | 52        |
| V.2 - Les domaines lipidiques.....  | 54        |
| V.3 - Polymorphisme lipidique au sein de la membrane.....   | 54        |
| V.4 - Potentiel de membrane, constante diélectrique.....  | 56        |
| <i>VI - Influence des propriétés physiques de la bicouche lipidique sur l'activité et la structure des protéines.....</i> | <i>57</i> |
| VI.1 - Influence des têtes polaires.....  | 57        |
| VI.2 - L'épaisseur de la bicouche.....  | 58        |
| VI.3 - La viscosité membranaire.....  | 59        |
| VI.4 - Effets de la courbure membranaire.....   | 59        |
| <i>VII - Les systèmes modèles lipidiques.....</i>   | <i>63</i> |
| <b>MATERIEL ET METHODES .....</b>   | <b>68</b> |
| <b>A - PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES.....</b>   | <b>70</b> |
| <i>I - Clonage du domaine de translocation.....</i>   | <i>70</i> |
| <i>II - Clonage de Tm et Ts (C454-S877 et K547-S877 respectivement dans la BoNT/A entière).....</i>                       | <i>71</i> |



|  |           |
|--|-----------|
| III - Séquençage.....  | 73        |
| <b>B – EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTEINE .....</b>                   | <b>74</b> |
| I - Extraction des protéines à partir des culots bactériens .....            | 74        |
| II - Purification par chromatographie d'affinité et repliement.....          | 75        |
| II.1 - Purification sur colonne d'affinité au Nickel .....                   | 75        |
| II.2 - Repliement de la protéine recombinante Tm.....                        | 76        |
| III - Purification par chromatographie d'exclusion de taille.....            | 76        |
| IV - Dessalage des protéines et lyophilisation .....                         | 76        |
| <b>C - OBTENTION DES VESICULES LIPIDIQUES .....</b>                          | <b>77</b> |
| I - Rappels sur les mécanismes de formations des vésicules lipidiques.....   | 77        |
| II - Préparation des vésicules lipidiques .....                              | 78        |
| II.1 - Obtention de petites vésicules unilamellaires (SUVs).....             | 78        |
| II.2 - Obtention de grandes vésicules unilamellaires (LUVs).....             | 79        |
| II.3 - Préparation de vésicules lipidiques chargées en sulforhodamine B..... | 82        |
| II.4 - Caractérisation des vésicules par diffusion de lumière .....          | 82        |
| <b>D – ANALYSES SPECTROSCOPIQUES .....</b>                                   | <b>83</b> |
| I - Dichroïsme Circulaire .....  | 83        |
| II - Fluorescence .....  | 85        |
| II.1 - Fluorescence du Tryptophane.....                                      | 85        |
| II.2 - Quenching de fluorescence par les lipides bromés.....                 | 86        |
| II.3 - Expériences de perméabilisation de vésicules lipidiques.....          | 87        |
| II.4 - Expériences de FRET Tryptophane/Dansyl-DHPE.....                      | 89        |
| II.5 -Expériences de partition suivies par centrifugation.....               | 91        |
| II.6 -Expériences de diffusion de la lumière.....                            | 92        |
| <b>E – EXPERIENCES DE PONTAGE AU GLUTARALDEHYDE .....</b>                    | <b>92</b> |
| <b>F – EXPERIENCES D'ÉCHANGE HYDROGENE/DEUTERIUM.....</b>                    | <b>93</b> |
| I - Principe général de l'expérience.....                                    | 93        |
| II - Deutération de l'apomyoglobine.....                                     | 94        |
| III - Incubation.....  | 95        |
| IV - Cinétiques d'échange D/H.....   | 95        |
| V - Digestion enzymatique.....   | 95        |
| VI - Séparation des peptides par HPLC.....                                   | 96        |
| VII - Analyses par spectrométrie de masse .....                              | 96        |
| VII.1 Principe.....  | 96        |
| VII.2 Analyse par MALDI-TOF.....   | 96        |
| VII.3 Analyse par Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....              | 97        |

## **RESULTATS ..... 100**

|  |            |
|--|------------|
| <b>A - BIOLOGIE MOLECULAIRE .....</b>  | <b>104</b> |
| I - Stratégie initiale .....   | 104        |
| II - Clonage de la séquence codant pour les domaines de translocation et catalytique de la toxine botulique..... | 105        |
| II.1 - Mutations .....   | 106        |
| II.2 - Test de production de la protéine recombinante C+T.....   | 107        |
| III - Recours à l'utilisation d'un gène de synthèse .....  | 107        |
| IV - Production et purification.....   | 108        |
| IV.1 - Production et extraction des protéines.....   | 108        |
| IV.2 - Purification des protéines recombinantes.....   | 108        |
| <b>B - CARACTERISATION DE T<sub>M</sub> EN SOLUTION ET EN PRESENCE DE SURFACTANT FLUORE (C8FTAC).....</b>        | <b>110</b> |
| I - Structure et solubilité.....   | 110        |
| I.1 - Structure en solution à pH7.....   | 110        |
| I.2 - Solubilité en fonction du pH.....  | 111        |
| I.3 - Structure en fonction du pH en présence C8FTAC.....  | 112        |

|  |            |
|--|------------|
| C - CARACTERISATION DU COMPORTEMENT DE T <sub>M</sub> EN PRESENCE DE VESICULES LIPIDIQUES.....         | 114        |
| I - Caractérisation de l'interaction de T <sub>m</sub> avec la bicouche lipidique.....                 | 114        |
| II - Caractérisation structurale.....  | 119        |
| II.1 - Dichroïsme circulaire.....  | 119        |
| II.2 - Fluorescence intrinsèque du tryptophane.....  | 120        |
| II.3 - Perméabilisation de vésicules lipidiques.....   | 123        |
| II.4 -RESULTATS PRELIMINAIRES : Expériences de pontage au glutaraldéhyde.....                          | 135        |
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>   | <b>138</b> |
| A DISCUSSION.....  | 140        |
| B PESPECTIVES.....   | 150        |
| <b>MECANISME D'INTERACTION DE L'APOMYOGLOBINE AVEC LES MEMBRANES .....</b>                             | <b>154</b> |
| A - INTRODUCTION.....  | 156        |
| B - RESULTATS.....   | 157        |
| I - Effet du pH.....   | 157        |
| II - Caractérisation de l'interaction de l'aMb avec les membranes.....                                 | 158        |
| III - Effet de l'aMb sur les vésicules lipidiques lors de son interaction.....                         | 161        |
| IV - Changements structuraux.....  | 163        |
| C - CONCLUSIONS.....   | 164        |
| <b>EXPERIENCES D'ECHANGES HYDROGENE/DEUTERIUM SUIVIES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....</b>              | <b>168</b> |
| A - INTRODUCTION.....  | 170        |
| B - PRINCIPES DES ECHANGES H/D.....  | 171        |
| I - Les protons échangeables.....  | 171        |
| II - Facteurs influençant la vitesse d'échange isotopique.....   | 172        |
| III - Mécanismes des échanges H/D.....   | 174        |
| D - RESULTATS.....   | 177        |
| I - Cartographie de l'apomyoglobine.....   | 177        |
| II - Cinétiques globales d'échange H/D.....  | 178        |
| III - Cinétiques locales d'échange H/D.....  | 181        |
| III.1 - Détails de profils isotopiques pour des ions doublement chargés : exemple du peptide 8-15..... | 181        |
| III.2 - Evolution de la masse moyenne de peptides après digestion enzymatique de l'aMB.....            | 183        |
| D - CONCLUSIONS.....   | 187        |
| <b>CONCLUSION GENERALE .....</b>   | <b>192</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>   | <b>198</b> |
| ANNEXE 1.....  | 200        |
| ANNEXE 2.....  | 204        |
| ANNEXE 3.....  | 206        |
| <b>PUBLICATIONS.....</b>   | <b>208</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>   | <b>239</b> |





## TABLE DES ILLUSTRATIONS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Exemples de toxines bactériennes à activité intracellulaire.....  | 19 |
| <b>Figure 2</b> : Schéma d'action d'une toxine de la famille AB.....  | 20 |
| <b>Figure 3</b> : Schéma des complexes botuliques et du trajet suivi par le complexe botulique lors de son ingestion.....   | 26 |
| <b>Figure 4</b> : Représentation de la structure cristallographique de BoNT/A.....  | 28 |
| <b>Figure 5</b> : Mécanisme d'action et spécificités des différents toxinotypes de BoNT.....  | 28 |
| <b>Figure 6</b> : modèle représentant BoNT/B lié à son récepteur sur la membrane présynaptique.....   | 29 |
| <b>Figure 7</b> : Internalisation de BoNT/B à la membrane présynaptique.....  | 30 |
| <b>Figure 8</b> : Cycle d'exocytose-endocytose des vésicules synaptiques à une terminaison nerveuse.....  | 31 |
| <b>Figure 9</b> : Domaine de translocation de la toxine botulique.....  | 33 |
| <b>Figure 10</b> : Translocation de la chaîne légère au travers du canal formé par la chaîne lourde de BoNT/A.....  | 34 |
| <b>Figure 11</b> : Modèle hypothétique de complexes de protéines SNAREs.....  | 36 |
| <b>Figure 12</b> : Les différentes étapes du processus d'exocytose.....   | 36 |
| <b>Figure 13</b> : Représentation des trois protéines recombinantes.....  | 37 |
| <b>Figure 14</b> : Vue schématique de la membrane plasmique d'une cellule eucaryote.....  | 40 |
| <b>Figure 15</b> : Distribution asymétrique des lipides dans les érythrocytes humains.....  | 41 |
| <b>Figure 16</b> : Les différents modes d'association des protéines aux membranes biologiques.....  | 41 |
| <b>Figure 17</b> : Représentation des deux principales classes de protéines membranaires.....   | 43 |
| <b>Figure 18</b> : Classification des principaux types de lipides d'après leur parenté structurale.....   | 46 |
| <b>Figure 19</b> : Les différentes parties d'une molécule de phosphatidylcholine.....   | 47 |
| <b>Figure 20</b> : Formules des principaux lipides des membranes plasmiques.....  | 49 |
| <b>Figure 21</b> : Diagramme de phase du sodium dodécyl sulfate (SDS).....  | 51 |
| <b>Figure 22</b> : Représentation du diagramme de phase du système modèle DMPC/H <sub>2</sub> O.....  | 51 |
| <b>Figure 23</b> : mouvements des phospholipides dans une membrane.....   | 53 |
| <b>Figure 24</b> : Auto-organisation de la lysophosphatidylcholine (LPC) et de la phosphatidylcholine.....  | 55 |
| <b>Figure 25</b> : Polymorphisme lipidique.....   | 56 |
| <b>Figure 26</b> : Exemples de mésappariements hydrophobes entre une protéine membranaire et la bicouche lipidique.....   | 58 |
| <b>Figure 27</b> : Courbure spontanée de la bicouche lipidique.....   | 59 |
| <b>Figure 28</b> : Les différents mécanismes de déformation de la membrane.....   | 60 |
| <b>Figure 29</b> : Domaines BAR de l'amphiphysine en interaction avec une membrane de faible rayon de courbure (haut) et de plus forte courbure (bas).....                            | 62 |
| <b>Figure 30</b> : Comparaison à l'échelle des différents types de vésicules lipidiques.....  | 65 |
| <b>Figure 31</b> : Schéma du plasmide PCR-Script dans lequel a été cloné le gène de synthèse codant pour T1 (Barbier_DIEP).....   | 70 |
| <b>Figure 32</b> : Electrophorèse sur gel d'agarose après amplification par PCR des domaines T <sub>m</sub> (1288 pb) et T <sub>s</sub> (1009 pb) à partir du vecteur pCR Script..... | 72 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 33</b> : Phénomènes mis en jeu lors de la formation de MLVs (multilamellar vesicles), de SUVs (small unilamellar vesicles) et de LUVs (large unilamellar vesicles) à partir de films lipidiques secs..... | 77  |
| <b>Figure 34</b> : Dispositif expérimental d'extrusion utilisé dans ce travail.....   | 80  |
| <b>Figure 35</b> : Schéma du montage des différents éléments centraux de l'extruder.....  | 81  |
| <b>Figure 36</b> : Représentation du C8FTAC.....  | 84  |
| <b>Figure 37</b> : Représentation d'un lipide bromé sur les Carbone 9 et 10 de la chaîne aliphatique.....   | 86  |
| <b>Figure 38</b> : Exemple de signal obtenu lors des expériences perméabilisation de vésicules lipidiques chargées en sulforhodamine B.....   | 87  |
| <b>Figure 39</b> : Principe de l'expérience de perméabilisation de vésicules lipidiques utilisée dans le cas de l'aMb.....  | 88  |
| <b>Figure 40</b> : Formule semi développée du Dansyl-DHPE.....  | 89  |
| <b>Figure 41</b> : Exemple de signal de fluorescence obtenu lors des expériences de FRET.....   | 90  |
| <b>Figure 42</b> : Protocole de l'expérience de partition suivie par centrifugation.....  | 91  |
| <b>Figure 43</b> : Protocole de l'expérience d'échange D/H en solution ou en présence de lipides.....   | 93  |
| <b>Figure 44</b> : Les trois domaines fonctionnels de BoNT/A.....   | 104 |
| <b>Figure 45</b> : Les différentes constructions prévues.....   | 106 |
| <b>Figure 46</b> : Mutagenèse dirigée.....  | 107 |
| <b>Figure 47</b> : Spectres de dichroïsme circulaire de Tm en solution à pH7.....   | 110 |
| <b>Figure 48</b> : Dépendance en pH de la solubilité de Tm seule en solution ou en présence de 0,15mM de C8FTAC.....  | 111 |
| <b>Figure 49</b> : formule du surfactant fluoré C8FTAC.....   | 112 |
| <b>Figure 50</b> : Spectres de dichroïsme circulaire de Tm en solution en présence de C8FTAC (0,15 mM), en fonction du pH.....  | 113 |
| <b>Figure 51</b> : Evolution du FRET Trp/Dansyl-DHPE en fonction du pH.....   | 115 |
| <b>Figure 52</b> : Exemple de lipide bromé utilisé lors des expériences d'inhibition de fluorescence.....   | 116 |
| <b>Figure 53</b> : Expériences d'extinction de fluorescence du tryptophane en fonction du pH.....   | 118 |
| <b>Figure 54</b> : Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain de Tm en présence de LUVs anioniques.....   | 119 |
| <b>Figure 55</b> : Représentation du domaine de translocation de BoNT/A.....  | 120 |
| <b>Figure 56</b> : Exemple de spectres de fluorescence intrinsèque d'une protéine et de l'évolution du rapport $IF_{360\text{ nm}}/IF_{320\text{ nm}}$ .....  | 121 |
| <b>Figure 57</b> : Dépendance en pH de l'environnement des Trps de Tm (0,5 $\mu$ M) en présence de C8FTAC (0,15mM) ( $\circ$ ) ou en présence de LUVs anioniques.....   | 122 |
| <b>Figure 58</b> : Cinétique de perméabilisation de LUVs anioniques par Tm.....   | 124 |
| <b>Figure 59</b> : Dépendance en pH de la vitesse initiale de perméabilisation de vésicules lipidiques anioniques par Tm.....   | 125 |
| <b>Figure 60</b> : Evolution du FRET Trp/Dansyl-DHPE en fonction du pH.....   | 126 |
| <b>Figure 61</b> : Expériences de perméabilisation de LUVs EPC et EPC/EPA (9 :1) en fonction du pH.....   | 128 |
| <b>Figure 62</b> : Cinétique de perméabilisation de vésicules lipidiques anioniques (EPC/EPA, 9 :1) par Tm à pH 4.....  | 130 |
| <b>Figure 63</b> : Evolution du diamètre des SUVs en fonction du temps.....   | 132 |
| <b>Figure 64</b> : Cinétique de perméabilisation de LUVs anioniques (EPC/EPA, 9 :1) par Tm et DT à un ratio L/P 500 à pH 4.....   | 133 |

|  |       |
|--|-------|
| <b>Figure 65</b> : Expériences de pontage au glutaraldéhyde de Tm en présence de C8FTAC (0,15 mM) à pH 7 et pH 4 .....   | 135   |
| <b>Figure 66</b> : Cinétiques de pontage au glutaraldéhyde de Tm en présence de C8FTAC (0,15 mM) et de LUVs anioniques (EPC/EPA 9 :1) à un ratio L/P 1000 .....      | 136   |
| <b>Figure 67</b> : Représentation des domaines de translocation de la toxine botulique (A) et de la toxine diphtérique (B).....                                      | 141   |
| <b>Figure 68</b> : Représentation d'un dimère de domaines BAR d'amphiphisine.....  | 146   |
| <b>Figure 69</b> : Représentation des régions potentiellement transmembranaires du domaine de translocation de la toxine botulique. ....                             | 148   |
| <b>Figure 70</b> : Formation du pore dans le cas de l'anthrax.....   | 149   |
| <b>Figure 71</b> : Exemples de protéines dont le repliement est de type globine.....   | 156   |
| <b>Figure 72</b> : Evolution du $\lambda_{max}$ de l'aMb en fonction du pH.....  | 157   |
| <b>Figure 73</b> : Effet de la charge et de la force ionique sur la liaison de l'aMb aux LUVs en fonction du pH .....  | 159   |
| <b>Figure 74</b> : Evolution de la diffusion de la lumière de LUVs en présence d'aMb.....  | 162   |
| <b>Figure 75</b> : Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV-lointain de l'aMb .....   | 163   |
| <b>Figure 76</b> : Schéma récapitulatif de l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique. ...  | 165   |
| <b>Figure 77</b> : Les protons dans la protéine .....  | 172   |
| <b>Figure 78</b> : Schéma des échanges H/D au niveau des protons amides d'une protéine.....  | 173   |
| <b>Figure 79</b> : Influence du pH sur la vitesse des échanges H/D .....   | 173   |
| <b>Figure 80</b> : Carte peptidique de l'aMb.....  | 178   |
| <b>Figure 81</b> : Cinétiques globales d'échange D/H.....  | 179   |
| <b>Figure 82</b> : Détails des profils isotopiques obtenus pour un ion doublement chargés correspondant au peptide 8-15 .....  | 182   |
| <b>Figure 83</b> : Evolution de l'enveloppe isotopique du peptide 8-15 en fonction du temps d'échange D/H .....  | 183   |
| <b>Figure 84a</b> : Cinétiques d'échange D/H locales pour des peptides obtenus après digestion à la pepsine ou la protéase de type XIII : Région de l'hélice A ..... | 184   |
| <b>Figure 84b</b> : Cinétiques d'échange D/H locales pour des peptides obtenus après digestion à la pepsine ou la protéase de type XIII : Région de l'hélice G ..... | 11841 |
| <b>Figure 85</b> : Régions de l'aMb impliquées dans l'interaction avec les membranes .....   | 187   |
| <b>Figure 86</b> : Cinétiques globales d'échange D/H pour l'aMb .....  | 188   |
| <b>Figure 87</b> : Schéma récapitulatif de l'interaction de l'aMb avec les membranes .....   | 189   |

## INDEX DES TABLEAUX

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tableau 1</b> : Cibles des différentes neurotoxines botuliques et leurs sites de clivage. .... | 36  |
| <b>Tableau 2</b> : quelques acides gras les plus représentés dans les membranes plasmique.....    | 47  |
| <b>Tableau 3</b> : Taille des différents type de vésicules utilisées. ....                        | 132 |





# *INTRODUCTION*



|                  |
|------------------|
| <b>PREAMBULE</b> |
|------------------|

De nombreuses maladies chez l'Homme sont causées par de puissantes toxines produites par des bactéries pathogènes. Il existe deux grands types de toxines bactériennes : les toxines membranolytiques et les toxines à activité intracellulaire.

Les toxines membranolytiques agissent au niveau de la membrane plasmique de la cellule cible. Elles forment des pores ou désorganisent la membrane plasmique, ce qui conduit à la mort cellulaire. Plusieurs classes de toxines membranolytiques ont été répertoriées en fonction de leur activité: les toxines formatrices de pores, les toxines à activités détersives, les phospholipases et les sphingomyélinases. La plupart de ces toxines sont sous forme monocaténaire lorsqu'elles sont en solution et s'oligomérisent lors de leur interaction avec leur récepteur à la membrane plasmique.

Les toxines à activité intracellulaire sont construites sur le modèle  $A_nB_m$ . B (pour « Binding ») est le fragment de la toxine qui contient toute la machinerie nécessaire à l'internalisation de la toxine et délivre la composante à activité enzymatique A (pour « Activity »); n indique le nombre de fragments A liés à  $B_m$  et m précise l'état d'oligomérisation du fragment B. Les toxines AB sont classées en trois groupes : (1) les toxines AB composées d'un fragment A et d'un fragment B uniques, telles que la toxine diphtérique et les neurotoxines clostridiales ; (2) les toxines  $AB_5$  ayant un fragment B pentamérique dont un exemple connu est la toxine pertussique ; et (3) les toxines  $A_nB_7$ , dont un exemple connu est le complexe toxique du charbon produit par *Bacillus anthracis*. La Figure 1 illustre quelques exemples de toxines à activité intracellulaire.

Les toxines à activité intracellulaire sont généralement composées de 3 domaines structuraux. Chacun joue un rôle bien défini dans le processus d'intoxication :

- Le domaine de liaison au récepteur : il reconnaît le récepteur à la membrane plasmique de la cellule cible.
- Le domaine de translocation : il permet le passage du domaine catalytique dans le cytosol de la cellule cible.
- Le domaine catalytique : il porte l'activité de la toxine. Au moins six activités enzymatiques des domaines catalytiques ont été répertoriées. Ce sont des activités ADP-ribosyltransférase, dépurinase, déamidase, zinc-endopeptidase, glucosyltransférase et adénylate-cyclase (Ménétrety *et al.*, 2005).

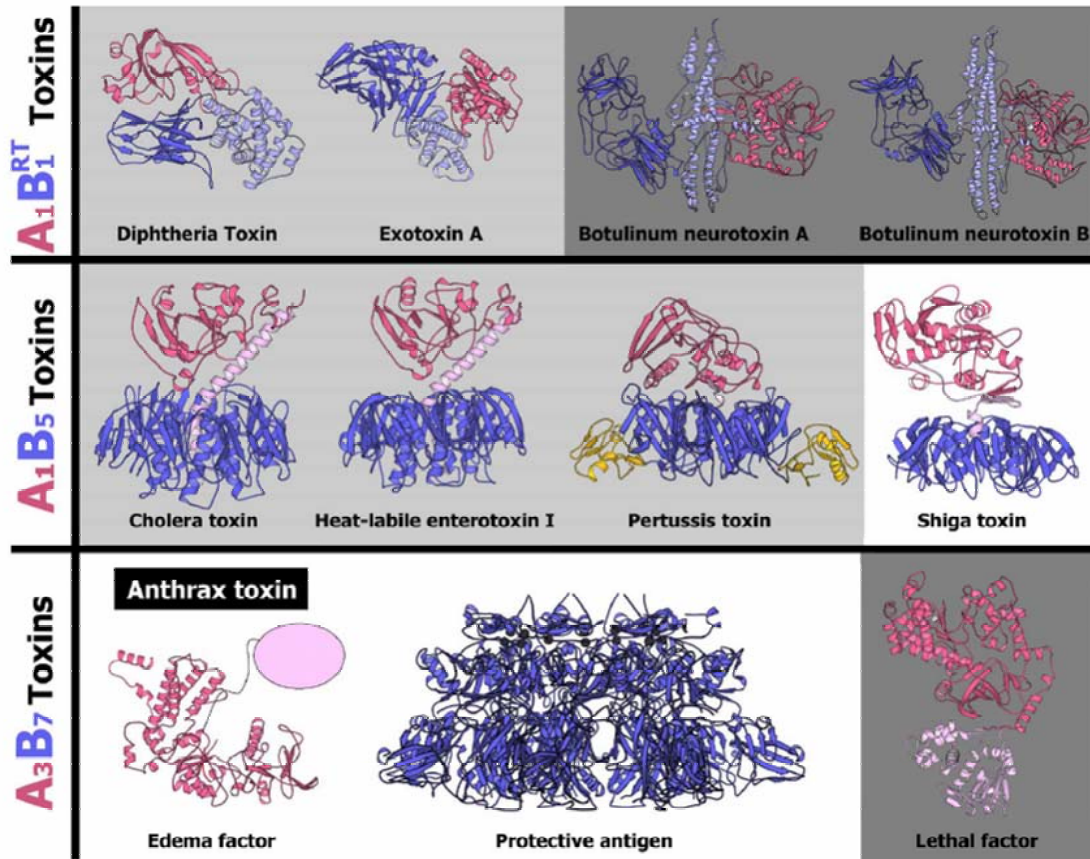
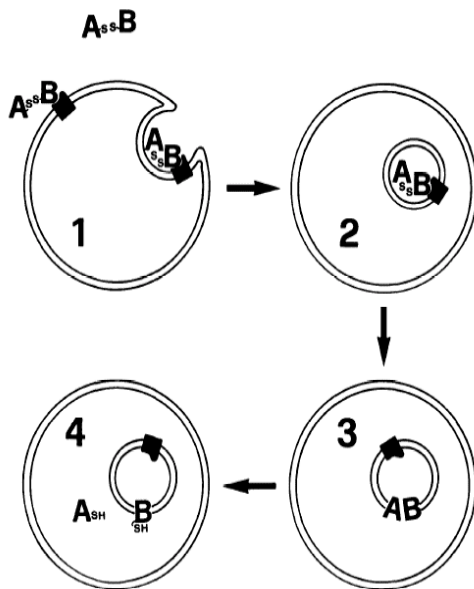


Figure 1 : Exemples de toxines bactériennes à activité intracellulaire. Les trois principaux assemblages des modules A et B sont représentés ici :  $A_1B_1^{RT}$  (R et T pour domaines de liaison au Récepteur et de Translocation respectivement),  $A_1B_5$  et  $A_3B_7$ . D'après Ménétreay *et al.*, 2005.

Le mode d'action des toxines  $A_1B_1^{RT}$  est schématisé Figure 2. Ces toxines sont synthétisées sous forme d'une chaîne polypeptidique unique dont le clivage conduit à une toxine dite « active » dans laquelle les fragments A et B sont reliés par un pont disulfure. Dans la première étape de l'intoxication, la toxine  $A_1B_1^{RT}$  se lie à son récepteur à la membrane plasmique. Cela induit l'internalisation de la toxine liée à son récepteur par endocytose. Il s'agit très souvent d'endocytose médiée par les puits recouverts de clathrine. Ensuite la toxine se retrouve dans le compartiment endosomal de la cellule cible. L'acidification de l'endosome conduit à des changements conformationnels du domaine de translocation de la toxine AB pouvant aboutir à la formation d'un état partiellement replié dit « molten-globule » comme observé pour le domaine de translocation de la toxine diphtérique (Chenal *et al.*, 2002). Ce dernier est alors apte à interagir avec les membranes. Cette interaction peut conduire à la formation de canaux grâce auxquels le fragment A ou domaine catalytique passe dans le cytosol de la cellule cible. S'il n'y a pas de canal formé dans la membrane de l'endosome, il est probable que l'interaction du domaine de

translocation avec la membrane la déstabilise suffisamment pour permettre au domaine catalytique d'atteindre le cytosol où il accomplira son activité.

L'étape d'interaction du domaine de translocation avec les membranes ainsi que les possibles changements conformationnels qui l'accompagnent sont à ce jour très mal définis voire inconnus pour un grand nombre de toxines, dont la toxine botulique.



*Figure 2 : Schéma d'action d'une toxine de la famille AB d'après Montecucco et al., 1994. Les deux fragments A et B de la toxine active sont reliés par un pont disulfure. L'action d'une toxine AB peut se résumer en 4 étapes. (1) Le fragment B se lie à son récepteur à la membrane plasmique. La toxine est internalisée par endocytose et se retrouve dans les endosomes. (2) Avec l'acidification du compartiment endosomal, le fragment B se détache de son récepteur et subit des changements conformationnels pouvant mener à une forme dite « molten-globule » du domaine de translocation. Cette forme est apte à interagir avec la membrane endosomale pour former un canal ou la déstabiliser suffisamment (3) pour faire passer le fragment A dans le cytosol de la cellule cible. (4) Clivage du pont disulfure entre fragments A et B. Le fragment A atteint son substrat catalytique.*

La caractérisation des mécanismes d'action de ces toxines permettrait de synthétiser des inhibiteurs spécifiques capables d'agir même après internalisation de la toxine dans la cellule cible. Ainsi, ce type d'étude ouvre la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques spécifiques dont l'action serait moins limitée dans le temps comme c'est le cas des sérothérapies, car les anticorps ne peuvent entrer dans les cellules cibles. Ces toxines représentent également un danger dans le cas d'une utilisation malveillante, d'où la nécessité de savoir se prémunir de leurs effets de façon efficace après exposition à la toxine.

D'autre part, certaines de ces toxines sont utilisées comme agents thérapeutiques. C'est notamment le cas de la toxine botulique. Cette dernière a pour effet de causer une paralysie flasque. Cette propriété est utilisée dans le traitement de nombreuses pathologies (blépharospasme, dysphonie spastique, myopathie orbitale, etc...). Une autre possibilité d'utilisation thérapeutique de ces toxines est la construction de protéines chimères ciblant spécifiquement des cellules malades, dans le cas de cancers par exemple.

|                                |
|--------------------------------|
| <b>A - LA TOXINE BOTULIQUE</b> |
|--------------------------------|

### **I - Historique du botulisme**

Le botulisme est une affection du système nerveux qui touche l'homme et les animaux. Il est le plus souvent d'origine alimentaire. Il cause des paralysies flasques. Le terme de botulisme a pour origine le mot latin *botulus*, désignant une saucisse. La première description détaillée des symptômes du botulisme a été rapportée par le médecin allemand Justinus Kerner en 1755 et 1789. Le nombre de cas observés suite à la consommation de saucisses, s'accroît à la fin du XVIII<sup>ème</sup> et au début du XIX<sup>ème</sup> siècle. Les recherches s'orientent alors vers la présence de toxiques dans les saucisses. Des cas similaires sont observés en Russie suite à la consommation de poisson fumé. La nature bactérienne de cette affection est identifiée au XIX<sup>ème</sup> siècle. Emile Van Ermengem isola pour la première fois en 1897 une bactérie anaérobie sporogène et toxigène d'un jambon ainsi que de l'intestin et de la rate d'une des trois victimes d'un groupe de 34 musiciens contaminés en Belgique en 1895. Des échantillons de culture du bacille et de filtrats provoquent les mêmes symptômes chez des animaux et même la mort. Ainsi, Van Ermengem démontra l'origine toxinologique de la maladie et appela l'organisme *Bacillus botulinus*. Ce n'est qu'en 1924 que le genre *Clostridium* apparaît afin de distinguer au sein des bacilles sporulants ceux qui sont aérobies (*Bacillus*) des anaérobies (*Clostridium*). La bactérie à l'origine du botulisme se nomme alors *Clostridium botulinum*. Les épisodes de botulisme qui suivirent ont permis de définir sept toxinotypes, nommés A à G, d'après les propriétés antigéniques des toxines.

### **II - Les Clostridium**

Les neurotoxines botuliques (BoNTs) sont produites par plusieurs espèces de *Clostridium*. Le genre *Clostridium* regroupe les bacilles à Gram positif, anaérobies stricts sporulés. Initialement *Clostridium botulinum* désignait les bactéries capables de produire des BoNTs induisant une paralysie flasque chez l'homme et l'animal. Mais l'espèce ainsi définie regroupait des souches aux caractéristiques physiologiques, biochimiques et génétiques très différentes. Des souches appartenant à d'autres espèces de *Clostridium* sont capables de produire une BoNT et ont été isolées à la suite de cas de botulisme. C'est le

cas de certaines souches de *Clostridium butyricum* qui synthétisent BoNT/E et de certaines souches de *Clostridium baratii* qui produisent BoNT/F.

Grâce à leurs spores résistantes aux conditions extrêmes (chaleur, sécheresse, radiation, oxygène), ces bactéries sont capables de survivre pendant de très longues périodes. Ainsi, les *Clostridium* sont largement distribués dans l'environnement. Mais leur habitat est limité : la germination des spores et la prolifération bactérienne ne peuvent avoir lieu qu'en conditions anaérobies et en présence de nutriments. Les zones où les *Clostridium* neurotoxigènes peuvent survivre doivent donc être suffisamment riches en matière organique et être anaérobies ou avec de faibles tensions en oxygène.

L'habitat principal de *C. botulinum* A, B, E, F, G est le sol et les sédiments marins ou d'eau de source. Les toxotypes A et B sont surtout retrouvés dans les échantillons de sol, mais avec des localisations différentes. *C botulinum* A est prédominant dans la partie Ouest des Etats-Unis, en Amérique du Sud et en Chine, alors que *C botulinum* B est plus fréquent dans la partie Est des Etats-Unis et en Europe. *C botulinum* E a la capacité de se multiplier et de produire des toxines à basse température (8 °C). Il est rencontré préférentiellement dans les sédiments marins et d'eau douce, ainsi que dans le contenu intestinal des poissons des régions nordiques de l'hémisphère Nord. *C botulinum* C et D ont une température optimale de croissance entre 30 °C et 40 °C, de plus ils sont exigeants en matière organique. Il en résulte une localisation dans des zones riches en matière organique des pays chauds. Les cadavres d'animaux morts de botulisme ou porteurs de *C botulinum* dans leur tube digestif sont les principaux réservoirs de ces microorganismes. *C butyricum* et *C. baratii* sont des bactéries largement répandues dans l'environnement (sols, sédiments, surface des végétaux, végétaux en décomposition, contenu intestinal de l'homme et des animaux sains). La distribution des souches neurotoxigènes de ces espèces est mal connue.

### **III - Modes de contamination du botulisme et formes cliniques**

#### **III.1 - Modes de contamination**

L'apparition de pathologies dues à la production de neurotoxines par *Clostridium* est accidentelle chez les mammifères. La porte d'entrée est généralement la voie orale ou tégumentaire à la faveur d'une effraction cutanée.

Le botulisme se caractérise par des paralysies neuromusculaires de type flasque. Les premiers signes sont oculaires (diplopie, troubles de l'accommodation), puis des difficultés à la déglutition avec sécheresse de la bouche et constipation s'installent. Ensuite, les nerfs crâniens sont atteints (paralyse de la face) puis les membres (fatigue, faiblesse puis paralysie généralisée). Ces troubles sont dus à une inhibition de la transmission cholinergique périphérique. Ils concernent aussi le système nerveux autonome. Dans les formes graves de botulisme la maladie évolue vers une asthénie et une paralysie de l'ensemble des muscles avec troubles respiratoires. La mort survient par insuffisance respiratoire, suite à une paralysie du diaphragme.

Selon les modes de contamination, on distingue trois formes de botulisme chez l'homme.

L'intoxication alimentaire survient après la consommation d'aliments contaminés par *C. botulinum* et dans lesquels la BoNT a été produite. L'ingestion de la toxine préformée est suffisante pour provoquer les symptômes de la maladie. Le temps d'incubation peut durer entre 5 h et 8 j, mais il est généralement compris entre 12 h et 36 h.

Le botulisme néonatal résulte d'une toxi-infection. L'ingestion de spores ou de formes végétatives de *Clostridium* neurotoxinogènes peut dans certaines conditions, s'accompagner d'une multiplication bactérienne et de production de toxine dans le tube digestif. Habituellement, le tube digestif des adultes et celui des enfants de plus de 6 mois possèdent les défenses naturelles suffisantes pour empêcher la germination des spores et la multiplication de *C. botulinum*. Chez le nouveau-né, la flore intestinale est encore incomplètement constituée et fonctionnelle. Elle n'a pas ou peu d'effet sur la croissance de *C. botulinum* et la germination des spores : c'est le botulisme infantile. La toxi-infection botulique peut aussi survenir chez l'adulte après perturbation de la flore intestinale par des agents anti-microbiens ou perte de l'intégrité de la muqueuse par lésions ou inflammations chroniques. Ces phénomènes permettent une multiplication locale de *C. botulinum*.



La troisième forme, beaucoup plus rare, est le botulisme par blessure. Il survient par contamination de plaies profondes ayant une faible ouverture sur l'extérieur, donc favorables au développement de bactéries anaérobies. La présence de tissus nécrosés stimule la croissance de *C. botulinum* en apportant les nutriments nécessaires.

### **III.2 - Le botulisme humain**

Le botulisme humain est dû aux neurotoxines de type A, B, E produites par *C. botulinum* et *C. butyricum* et aux neurotoxines de type C et F de façon exceptionnelle. Le type A est à l'origine de la forme la plus grave de botulisme. La dose létale pour un homme adulte est estimée entre 0,1-1µg de BoNT/A par voie orale (la dose létale 50 est de 1-5 ng/kg pour la souris). Le botulisme le plus fréquent en France est celui de type B, développé à la suite de consommation de jambon salé et non cuit ou de charcuteries familiales. Depuis quelques années on observe des cas de botulisme de type E. Ils sont consécutifs à la consommation de produits de la mer. Malgré l'évolution des habitudes alimentaires favorisant la consommation de plats cuisinés achetés dans le commerce au détriment des conserves familiales, le nombre de cas de botulisme n'a pas diminué. En effet, les modes de conservation des aliments (emballage sous vide d'aliments frais ou pasteurisés et conservés réfrigérés) sont propices à la multiplication des souches de *Clostridium* neurotoxinogènes (Haeghebaert *et al.*, 2002).

### **III.3 - Le botulisme chez l'animal**

Les cas de botulisme déclaré chez les animaux restent néanmoins rares. *C. botulinum* C et D sont responsables du botulisme animal. *C. botulinum* C est responsable du botulisme chez les oiseaux et *C. botulinum* D du botulisme chez les mammifères et les bovins. La principale cause de botulisme animal est la toxi-infection d'origine alimentaire. Le botulisme animal ne fait pas l'objet d'une surveillance aussi précise que le botulisme humain. En France, le botulisme de type C cause de lourdes pertes parmi les oiseaux sauvages, en particulier les canards et autres oiseaux aquatiques en saison chaude et sèche. Les cadavres d'oiseaux porteurs de *C. botulinum* ou morts de botulisme constituent le principal véhicule du microorganisme aux autres oiseaux. Des foyers sont également répertoriés sporadiquement dans les élevages. La contamination est dans ce cas, vraisemblablement due à la consommation d'aliments contenant des farines de viandes.

Mais les aliments végétaux peuvent également être porteurs de cette bactérie puisqu'elle se développe également dans les sols. La situation du botulisme bovin est actuellement endémique dans les régions Ouest de la France.

## **IV - Les complexes botuliques**

### **IV.1 - Composition**

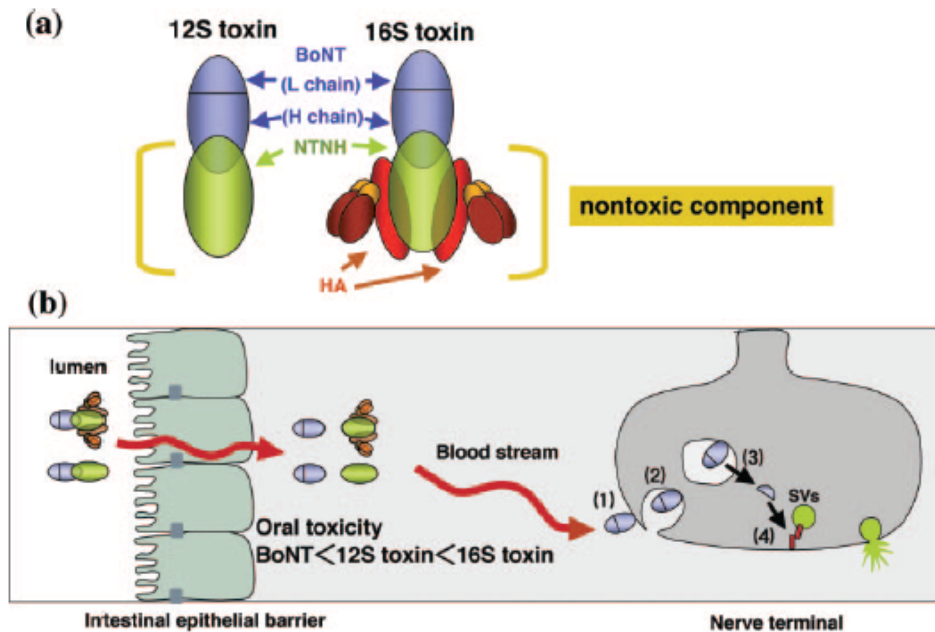
Les BoNTs sont libérés dans le milieu sous forme de complexes. Elles sont associées à des protéines non toxiques (ANTPs Associated Non Toxic Proteins). Ces complexes contiennent une protéine appelée « non toxique non hémagglutinine » (NTNH) et des protéines aux propriétés hémagglutinantes (HA). BoNT s'associe à NTNH pour former des complexes de tailles différentes. Ainsi existe-t-il des complexes dits 12S, 16S et 19S. Le complexe 12S est composé de la toxine et d'une protéine NTNH, sa masse est d'environ 300 kDa. Le complexe 16S, dit complexe de grande taille (500 kDa), contient en plus de la protéine NTNH, 2 protéines aux propriétés hémagglutinantes. Enfin, le complexe 19S (900 kDa) est observé chez *C. botulinum* A. Ce dernier résulte probablement de la dimérisation de complexes 16S qui seraient reliés de façon non covalente par une protéine HA.

Les complexes sont différents selon le type de toxine et de souche. Ainsi, chez *C. botulinum* A des complexes 12S, 16S et 19S ont été observés, alors que seuls des complexes 12S et 16S sont observés chez *C. botulinum* B, C et D. Seul le complexe de type 12S est observé chez *C. botulinum* E et F et chez *C. botulinum* G seul le complexe 16S existe. Le complexe botulique de BoNT/D est schématisé dans la Figure 1a.

Il existe quatre types de protéines HA : HA1, HA2, HA3a et HA3b. HA3a et 3b résultent du clivage d'une chaîne polypeptidique unique HA3 ou HA70. Pour le sérotype BoNT/A HA1 est appelée HA35, HA2 : HA15, HA3a : HA19-20 et HA3b : HA-52. Ces nomenclatures font référence à la masse moléculaire de la protéine concernée.

L'origine et la fonction des complexes botuliques sont encore mal définies. Les protéines NTNH pourraient protéger les BoNTs de l'acidité gastrique et des protéases digestives. En effet, il semble que des pHs alcalins soient nécessaires pour dissocier les BoNTs des protéines non toxiques associées. D'autre part, le complexe de 900 kDa observée chez *C. botulinum* A est résistant à la protéolyse. Étonnamment, exposés séparément à des

conditions similaires à celles du tractus digestif, les composantes non toxiques et les toxines sont dégradées. Il semble que chacun se protège mutuellement des agressions gastro-intestinales (Chen *et al.*, 1998).



**Figure 3 : Schéma des complexes botuliques et du trajet suivi par le complexe botulique lors de son ingestion.** (a) Schéma de l'arrangement d'un complexe 16S de la toxine BoNT/D (Suzuki *et al.*, 2005). Le complexe comprend une molécule de neurotoxine (bleu), une molécule de protéine NTNH, deux molécules HA3 (rouge), quatre molécules HA1 (marron) et quatre molécules HA2 (orange). Le complexe 12S est un hétérodimère de BoNT et NTNH. (b) Chemin suivi par les complexes botuliques de la lumière intestinale jusqu'au cytosol d'un motoneurone. Les toxines botuliques ingérées par voie alimentaire, doivent traverser la barrière intestinale pour causer la maladie. Après absorption par l'intestin grêle, les complexes passent dans le système lymphatique puis dans la circulation sanguine. Dans la lymphe et le sang les neurotoxines sont dissociées de leur complexe et se lient finalement à une terminaison nerveuse où elles agissent. L'inhibition de la libération de neurotransmetteur se fait en quatre étapes : (1) liaison à la membrane plasmique, (2) internalisation, (3) translocation dans le cytosol de la cellule cible, (4) clivage d'une protéine SNARE. D'après Fujinaga, 2006.

## **IV.2 - Passage de la barrière intestinale**

La BoNT se lie à un récepteur à la membrane plasmique apicale des entérocytes. Le complexe toxine-récepteur est transporté jusqu'à la membrane baso-latérale par un transport vésiculaire. La toxine passe alors dans le milieu extracellulaire par exocytose. Le récepteur à la membrane apicale est encore inconnu. Ce phénomène de transcytose permet à la BoNT de franchir la barrière digestive et d'atteindre la circulation sanguine et lymphatique pour ensuite se disséminer dans l'organisme (Fig. 3b). Le rôle des ANTPs dans le passage de la barrière intestinale est sujet à controverse.

Deux hypothèses sont proposées. La première hypothèse propose que les HA jouent le rôle de domaine de liaison au récepteur de la membrane apicale des entérocytes (Fujinaga *et al.*, 1997) (Fujinaga *et al.*, 2004). En effet, HA1 et HA3b sont capables de se lier à certains glycoconjugués présents à la surface des cellules. Il est probable que cette liaison soit à l'origine de l'internalisation. De plus, ces protéines HA ont des spécificités différentes ce qui laisse supposer que l'activation de l'internalisation doit avoir lieu en plusieurs étapes (Fujinaga 2006).

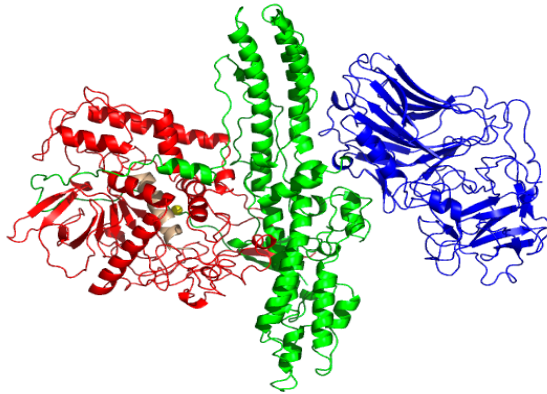
L'autre hypothèse propose que ce soit dans la BoNT elle-même que se trouve le domaine de liaison au récepteur à la membrane apicale des entérocytes (Maksymowich & Simpson 2004). D'autre part, des études ont montré que BoNT/A seule peut être absorbée efficacement à partir de l'estomac et que les protéines auxiliaires ne sont pas requises (Maksymowych *et al.*, 1999). Le domaine de liaison au récepteur de la toxine est impliqué dans le passage de la toxine au travers de la barrière intestinale (Maksymowych & Simpson 1998). Sa liaison à un récepteur à la membrane apicale des entérocytes entraîne l'internalisation de la toxine. De plus, il semble que les gangliosides de type GD1b et GT1b jouent le rôle de récepteur à la membrane plasmique (Couesnon *et al.*, 2007).

Une fois la barrière intestinale passée, la neurotoxine se retrouve dans la circulation systémique libérée de son complexe. Elle va finalement arriver à une terminaison nerveuse motrice au niveau de laquelle elle sera internalisée et exercera son activité.

## **V - La toxine botulique**

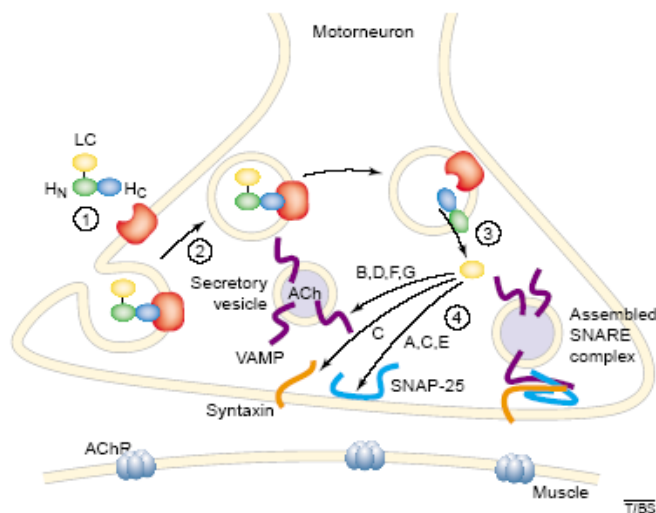
Les sept sérotypes de BoNT sont synthétisés par des bactéries du genre *Clostridium*. Ils présentent également une grande conservation de la séquence en acides aminés (Lacy & Stevens 1999) bien que présentant chacun des propriétés antigéniques différentes. Ces toxines appartiennent à la famille des toxines dites  $A_1B_1^{RT}$  et leur masse molaire est d'environ 150 kDa. Elles possèdent trois domaines distincts de 50 kDa, dont chacun porte une activité qui lui est propre : le domaine de liaison au récepteur à la membrane plasmique (R), le domaine de translocation (T) et le domaine catalytique. Synthétisée sous la forme d'une chaîne polypeptidique unique, la toxine ne sera « active » qu'après clivage protéolytique post-traductionnel. Les deux chaînes polypeptidiques résultantes sont nommées Chaîne Légère (L) et Chaîne Lourde (H). Elles sont reliées de façon covalente par un pont disulfure (C430-C454 pour BoNT/A). La Chaîne Légère est

constituée du domaine catalytique qui est une métalloprotéase, la Chaîne Lourde comprend le domaine de translocation ( $H_N$ ) et le domaine de liaison au récepteur ( $H_C$ ). Si on se réfère à la nomenclature des toxines bactériennes à activité intracellulaire, la Chaîne Légère correspond au fragment A et la Chaîne Lourde au fragment B. La structure cristallographique de la BoNT/A est représentée ci-dessous (Fig. 4).



*Figure 4 : Représentation de la structure cristallographique de BoNT/A (Lacy et al., 1998). En rouge, le domaine catalytique, en vert : le domaine de translocation, en bleu le domaine de liaison au récepteur.*

La toxine agit au niveau des jonctions neuromusculaires (Fig. 5). Le clivage de protéines SNAREs (Soluble NSF Associated protein Receptors) par le domaine catalytique a pour effet d'empêcher la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique. Cela a pour conséquence d'empêcher la libération d'acétylcholine. Chaque type de BoNT clive spécifiquement une protéine SNARE (Fig. 5).



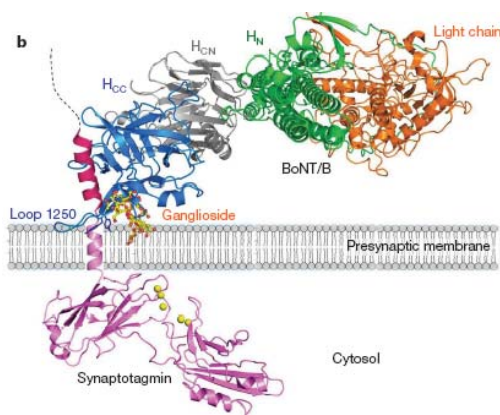
*Figure 5 : Mécanisme d'action et spécificités des différents toxinotypes de BoNT. (1) Liaison au récepteur à la membrane plasmique du domaine de liaison au récepteur ( $H_C$ ). (2) Internalisation de la toxine, routage vers l'endosome. (3) Interaction du domaine T ( $H_N$ ) avec la membrane de l'endosome et translocation du domaine catalytique (LC) (4) clivage de SNARE ayant pour conséquence l'inhibition de la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique. (D'après Turton et al., 2002)*

## VI - Mode d'action de la toxine botulique

Le mode d'action de la toxine botulique est commun à celui des toxines bactériennes à activité intracellulaire (Lalli *et al.*, 2003). Il peut être décomposé en quatre grandes étapes : (1) la liaison à un récepteur à la membrane plasmique d'un neurone, (2) internalisation par endocytose de la toxine, (3) translocation de la Chaîne Légère à travers la membrane de l'endosome dans le cytosol de la cellule cible, (4) action enzymatique conduisant à l'inhibition de la libération de neurotransmetteur.

### VI.1 - Liaison de la toxine botulique à son récepteur.

La toxine botulique se lie à son récepteur à la membrane plasmique par son domaine de liaison au récepteur. Cette liaison nécessite la présence de gangliosides de la série GD<sub>1b</sub> et GT<sub>1b</sub> pour les BoNT/A et BoNT/B. (Nishiki *et al.*, 1996). Le récepteur à la BoNT/A a été identifié plus récemment (Dong *et al.*, 2003 et 2006) (Mahrhold *et al.*, 2006). Il s'agit de SV2 (isoformes A, B et C), une protéine impliquée dans la régulation de la taille des vésicules synaptiques. Les synaptotagmines I et II sont les récepteurs protéiques à la membrane plasmique des cellules neuronales pour les BoNT/B et BoNT/G (Rummel *et al.*, 2004) (Nishiki *et al.*, 1994 et 1996). C'est ce double récepteur à la membrane plasmique (protéique et lipidique) qui est à l'origine de la très grande spécificité des neurotoxines botuliques pour les terminaisons nerveuses (Montecucco *et al.*, 2004). Des modèles sont proposés d'après les structures cristallographiques obtenues après co-cristallisation de BoNT/B avec le peptide de liaison de Syt-II (Fig. 6) (Chai *et al.*, 2006).

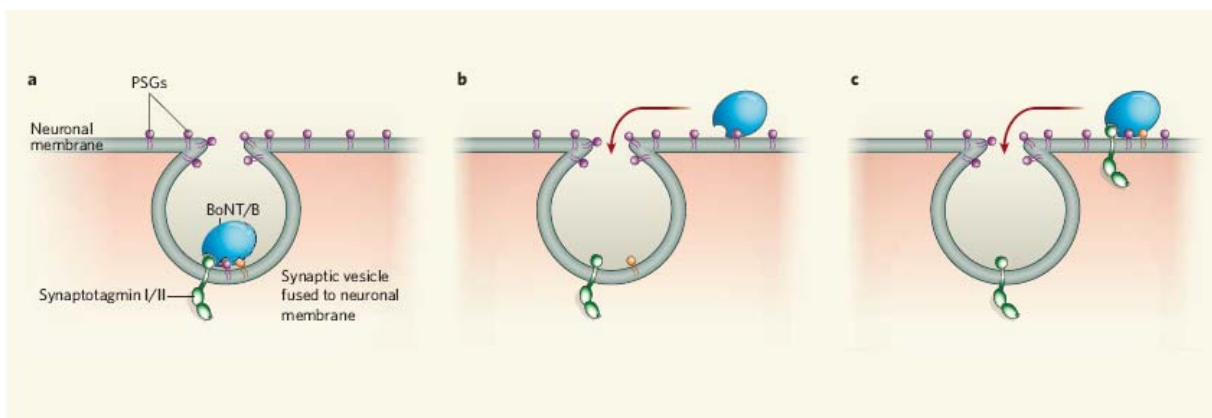


**Figure 6 : Modèle représentant BoNT/B lié à son récepteur sur la membrane présynaptique. BoNT/B est lié à son double récepteur : la synaptotagmine II (Syt-II) et à un ganglioside (GT<sub>1b</sub>) par la partie C-terminale de la chaîne lourde (le domaine de liaison au récepteur). D'après Chai *et al.*, 2006.**

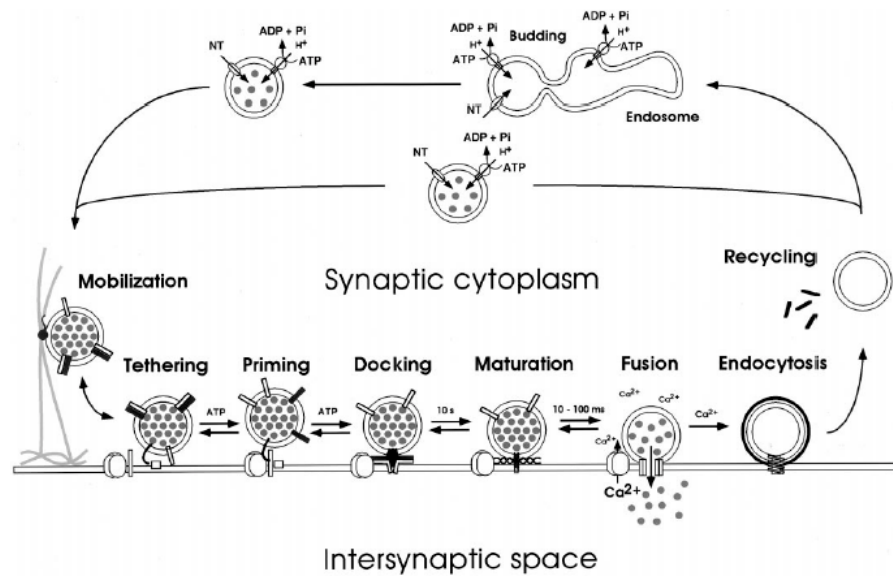
Une autre étude par cristallographie propose, tout comme Chai et ses collaborateurs que BoNT/B pénètre les neurones via les vésicules synaptiques (Jin *et al.*, 2006). D'autre part,

il a été montré que l'entrée de la toxine botulique dans la cellule se fait de façon concomitante à l'activité synaptique. En effet, des synapses actives, sont plus sensibles aux neurotoxines botuliques que celles au repos. Schiavo résume les hypothèses actuelles concernant la liaison de BoNT/B au neurone (Schiavo, 2006). Dans la première hypothèse, la toxine entre directement dans les vésicules synaptiques « fusionnées » à la membrane présynaptique et le complexe BoNT/B-SytI/II-ganglioside se forme alors. Une deuxième hypothèse propose que ce complexe ternaire se forme à la surface de la terminaison nerveuse et est ensuite transféré vers une vésicule synaptique. Mais il se peut également que le complexe se forme après fixation de BoNT/B à une synaptotagmine restée à la membrane et soit ensuite transféré dans le lumen d'une vésicule synaptique (Fig. 7).

Le cycle d'endocytose/exocytose des vésicules synaptiques à une terminaison nerveuse est présenté dans la Figure 8. La toxine botulique pourrait entrer dans la terminaison nerveuse lors de l'endocytose de la vésicule par la voie des puits recouverts de clathrine. Elle serait ensuite acheminée jusque dans l'endosome où l'acidification du pH l'activerait. Cela pourrait expliquer la plus grande efficacité de la toxine botulique sur des synapses actives, lorsque les phénomènes d'exocytose/endocytose sont très fréquents.



**Figure 7 : Internalisation de BoNT/B à la membrane présynaptique : a : BoNT/B entre directement dans la vésicule synaptique et forme le complexe requis pour son internalisation. b : BoNT/B se lie tout d'abord au polysialoganglioside puis le complexe est transféré dans la vésicule synaptique. c : le complexe est formé à la membrane. Il est ensuite transféré dans la vésicule synaptique. D'après Schiavo, 2006.**



**Figure 8 : Cycle d'exocytose-endocytose des vésicules synaptiques à une terminaison nerveuse.** Les neurotransmetteurs (NT) sont accumulés dans le lumen de la vésicule synaptique grâce à un processus dépendant du gradient de pH créé par une pompe à proton. La vésicule synaptique se déplace ensuite le long du cytosquelette. Une portion des vésicules synaptiques se lie ensuite à la face cytosolique de la membrane présynaptique via des interactions protéine/protéine dans une zone dite active. Cette phase de liaison à la membrane présynaptique se fait en plusieurs étapes aboutissant à l'amarrage de la vésicule synaptique à la membrane grâce au complexe trans-SNARE. Les vésicules ainsi « amarrées » sont capables de lier le  $Ca^{2+}$  et de fusionner avec la membrane. L'endocytose de la vésicule synaptique après fusion se fait par la voie des puits recouverts de clathrine. La vésicule est ensuite recyclée dans les endosomes. D'après Schiavo et al., 2000.

## **VI.2 - Internalisation et trafic intracellulaire de la toxine botulique**

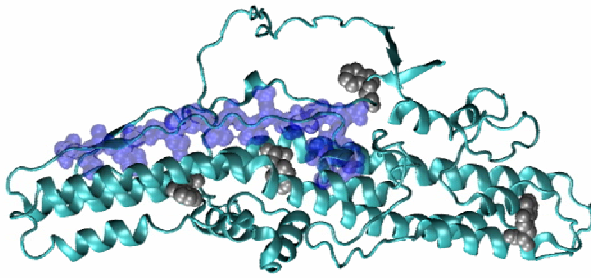
Le mécanisme régissant cette étape de l'action de la toxine botulique reste putatif à ce jour. Les hypothèses sont en grande partie fondées sur les connaissances que l'on a des mécanismes d'action des toxines  $A_1B_1^{RT}$ . Après liaison à son double récepteur membranaire (ganglioside+protéine), la toxine botulique continue son parcours dans les endosomes. Le mécanisme de translocation du domaine catalytique dans le cytosol n'est pas complètement élucidé. La toxine botulique appartient à la famille des toxines bactériennes à activité intracellulaire et présente des similarités structurales et fonctionnelles avec certaines d'entre elles. Parmi ces toxines, la toxine diphtérique est très bien caractérisée. Elle est internalisée par la voie des puits recouverts de clathrine puis va dans les endosomes. C'est lors de l'acidification du pH endosomal que le domaine de translocation de la toxine diphtérique subit des changements conformationnels et acquiert sa conformation active capable d'interagir avec les membranes. Cette dépendance en pH qui régit l'activité de la toxine diphtérique est commune à certaines toxines bactériennes à



activité intracellulaire (Ménétreay *et al.*, 2005) dont l'anthrax (Krantz *et al.*, 2006) et l'exotoxine A de *Pseudomonas* (Méré *et al.*, 2005).

Contrairement à la toxine diphtérique, le chemin parcouru par la toxine botulique dans la terminaison nerveuse est très mal connu. Cependant certains résultats expérimentaux tendent à montrer le passage de la toxine botulique dans les endosomes. L'inhibition de la pompe à protons (Fig. 8) nécessaire à l'acidification du pH endosomal par la bafilomycine A1 protège le muscle de l'action de la toxine à condition que la drogue ait été administrée avant ou de façon concomitante à l'administration de la toxine (Simpson *et al.*, 1994). Des études plus récentes montrent que la fonction de la toxine botulique, plus particulièrement l'étape de translocation de la chaîne légère, est régulée par le pH (Koriazova & Montal, 2003), (Fischer & Montal, 2007a).

Il est vraisemblable que suite à l'acidification du pH le domaine de translocation de la toxine botulique devienne actif, c'est-à-dire apte à interagir avec les membranes lipidiques. Cette interaction déstabiliserait suffisamment la membrane de l'endosome pour permettre le passage du domaine catalytique dans le cytosol. Il a été montré que la toxine diphtérique, tout comme la toxine botulique sont capables de former des canaux dont les diamètres sont définis (Hoch *et al.*, 1985), (Parikh & Singh, 2007), (Fischer & Montal, 2007a), (London, 1992), (Silverman *et al.*, 1994). La visualisation de ces canaux par microscopie électronique suggère que leur formation nécessite l'oligomérisation de BoNT pour former un tétramère (Schmid *et al.*, 1993). D'autre part, des études ont permis de déterminer des segments amphiphiles de la chaîne lourde potentiellement capables de s'insérer dans une bicouche lipidique : trois séquences ont ainsi été déterminées (595-614, 627-645, 648-691) (Lebeda & Olson, 1994). Il a été montré qu'un peptide appartenant à un de ces segments est capable de s'insérer dans les membranes. Ce peptide s'étend de l'acide aminé 659 à l'acide aminé 681 selon la numérotation dans la toxine entière (Oblatt-Montal *et al.*, 1995) (Fig. 9). Il est remarquable de constater que ce peptide n'est pas situé dans une hélice alpha du domaine de translocation mais dans une région qui n'est pas structurée. Ce peptide, probablement après oligomérisation, participe à la formation de canaux dans des bicouches planes. La structure cristalline de BoNT/A (Lacy & Stevens, 1998), ne permet pas de confirmer cette hypothèse.

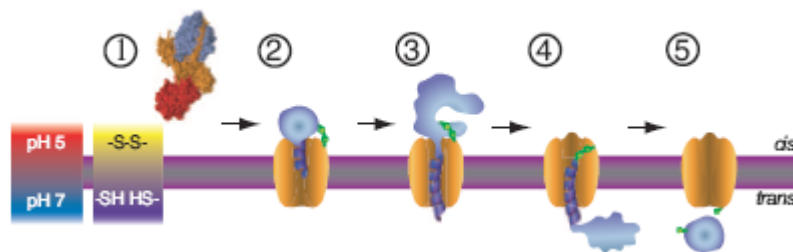


**Figure 9 : Domaine de translocation de la toxine botulique (BoNT/A PDB Id. 3BTA).** Les tryptophanes sont colorés en gris et la région transmembranaire (659-681) en bleu (Oblatt-Montal et al., 1995).

La taille des canaux ne permet pas le passage du domaine catalytique dans sa structure native. Ce dernier subirait des changements conformationnels importants afin de pouvoir passer dans le cytosol de la cellule cible (Bade *et al.*, 2004). D'autre part, il est proposé que la partie de la chaîne lourde en dehors de la membrane aurait une action de type « protéine chaperonne » permettant le repliement correct de la chaîne légère dans le cytosol (Koriazova & Montal, 2003). Des chaperonnes fonctionnant indépendamment de l'hydrolyse d'ATP ont été décrites dans la littérature. Ainsi, les auteurs comparent-ils la partie du domaine de translocation qui dépasse de la membrane à la préfoldine. La préfoldine est une protéine constituée de coiled-coil d'hélices  $\alpha$ , qui sous forme hexamérique assiste le repliement de peptides en cours de synthèse et qui *in vitro* joue le même rôle que la chaperonne HSP70 (Siegert *et al.*, 2000). D'autre part, il semble que la chaîne légère de la neurotoxine botulique de type A subisse des changements conformationnels à 37 °C conduisant à l'apparition d'un état dit « pré-molten globule » appelé PRIME (Pre-Imminent Molten-globule Enzyme). Cet état serait compétent pour la translocation au travers du pore formé par la partie N-terminale de la chaîne lourde (Kukreja & Singh, 2005). Dans cet article les auteurs montrent également que cet état partiellement déplié du domaine catalytique est plus actif que l'état natif d'un point de vue catalytique. Le dépliement partiel de la chaîne légère permettrait donc non seulement son passage dans le cytosol de la cellule cible, mais aussi son activation. Avec sur la face cytosolique de la membrane de l'endosome la partie du domaine de translocation qui jouerait le rôle de chaperonne indépendante de l'ATP, dont le rôle serait d'aider à replier partiellement la chaîne légère dont le passage à travers le pore formé nécessite au moins la perte de sa structure tertiaire.

Des études plus récentes menées sur BoNT/A et BoNT/E par le groupe de Montal (Fischer & Montal, 2007a et 2007b) étudient la dynamique des neurotoxines botuliques lors de leur translocation en utilisant des cellules neuronales excisées. Les mesures de dynamique sont effectuées grâce à la technique de patch-clamp. Les auteurs montrent que

la conductance du canal formé par la BoNT dans les membranes évolue au cours du passage de la chaîne légère, donc dans le temps. Le mécanisme de translocation des BoNT/A et E diffère. Si dans les deux cas, l'interaction entre la chaîne lourde et la chaîne légère est requise, le clivage du pont disulfure entre les deux chaînes est nécessaire à la translocation du domaine catalytique de BoNT/E. Le rôle du pont disulfure reliant chaînes lourde et légère est étudié plus précisément notamment pour la BoNT/A (Fischer & Montal, 2007b). La réduction du pont disulfure reliant les deux chaînes légère et lourde de la BoNT/A empêche la translocation de la chaîne légère et ce, même si le canal est déjà formé.



**Figure 10 : Translocation de la chaîne légère au travers du canal formé par la chaîne lourde de BoNT/A.** (1) BoNT/A avant son interaction avec la membrane. (2) vue schématique de la chaîne lourde de BoNT/A insérée dans la membrane. (3) et (4) translocation de la chaîne légère partiellement dépliée. (5) libération de la chaîne légère dans le cytoplasme après réduction du pont disulfure. D'après Fischer & Montal, 2007a.

Les auteurs proposent un modèle dans lequel la translocation nécessite des interactions étroites entre les deux chaînes (Fig. 10). La chaîne lourde jouant le rôle de protéine chaperonne empêchant l'agrégation de la chaîne légère. Une fois de plus, le pH régule ces phénomènes.

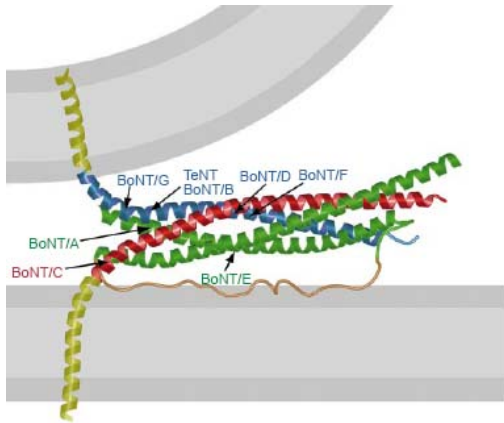
### **VI.3 - Activité enzymatique de la chaîne légère**

L'activité catalytique de la chaîne légère des BoNTs a pour conséquence l'inhibition de la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique (Humeau *et al.*, 2000). Pour ce faire, le domaine catalytique clive de façon spécifique une protéine de la famille SNARE (Soluble NSF Associated protein Receptors). Les chaînes légères des 8 types de neurotoxines sont des métalloprotéases à zinc, contenant le motif conservé His-Glu-X-X-His correspondant au site enzymatique et donc essentiel à l'activité de la toxine (Schiavo *et al.*, 1992), (Kurazono *et al.*, 1992). Elles clivent spécifiquement en des sites

distincts trois types de SNAREs impliquées dans la formation des complexes SNARE (Fig. 11, Tableau 1) nécessaires à la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique. Il s'agit de la protéine transmembranaire des vésicules synaptiques : VAMP (Vesicle Associated Membrane Protein) ou synaptobrevine et des protéines associées à la membrane présynaptique : SNAP25 (Synaptosomal Associated Protein of 25 kDa) et syntaxine. Les protéines SNAREs appartiennent à la machinerie d'exocytose de la synapse (Fig. 10). Elles forment un complexe ternaire servant de récepteur aux protéines SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) et NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor). Le clivage des SNAREs, avant formation du complexe SNARE, empêche la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique ce qui a pour conséquence le blocage de la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique.

BoNT/B, BoNT/D, BoNT/F et BoNT/G clivent la VAMP. BoNT/A et BoNT/E clivent SNAP25 et BoNT/C clive la syntaxine et SNAP25 (Tableau 1). Les protéines SNAREs ne peuvent être clivées par la BoNT lorsqu'elles sont sous forme de complexe. Les sites de clivage sont vraisemblablement masqués dans ce cas (Hayashi *et al.*, 1994) (Sutton *et al.*, 1998).

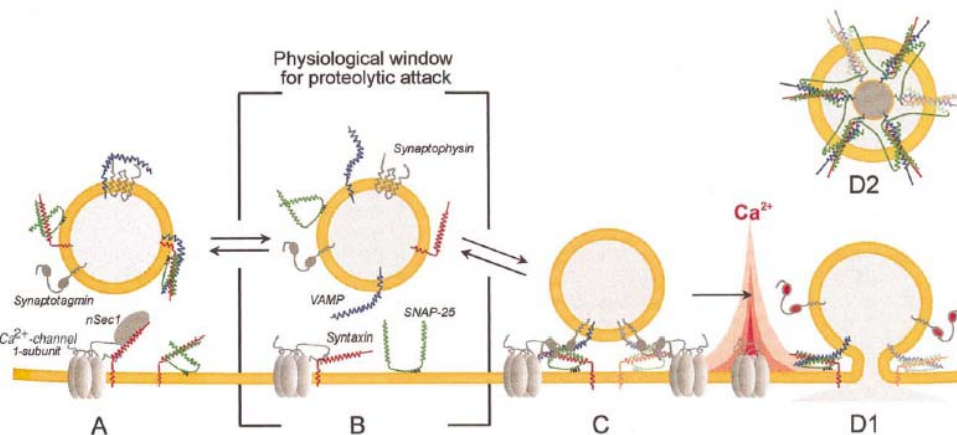
Le processus d'exocytose au niveau du bouton synaptique est représenté dans la Figure 12. Les vésicules synaptiques sont accumulées à proximité de la membrane présynaptique (Fig. 12A). Dans un deuxième temps, elles vont s'arrimer à la membrane présynaptique dans une zone proche des canaux calciques (Fig. 12B) et le complexe SNARE se forme (Fig. 12C). La dépolarisation de la membrane présynaptique entraîne une entrée massive d'ions  $Ca^{2+}$  qui va induire la réorganisation du complexe SNARE et la fusion de la vésicule synaptique avec la membrane présynaptique et la libération du neurotransmetteur (Fig. 12D1). Les toxines botuliques exercent leur activité catalytique avant ou pendant l'étape d'arrimage des vésicules synaptiques, avant formation du complexe SNARE. Il en résulte la formation de complexes SNARE non fonctionnels ; la libération du neurotransmetteur est inhibée.



**Figure 11 : Modèle hypothétique de complexes de protéines SNAREs.** La formation de ces complexes est un préalable indispensable à la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique. Les protéines SNAREs s'associent en complexe sous forme de quatre hélices alpha : syntaxine (rouge), synaptotagmine (vert), synaptobrevine ou VAMP (bleu). Les sites de clivage des différentes BoNTs et de la toxine tétanique (TeNT) sont représentés. D'après Sutton et al., 1998.

**Tableau 1 : Cibles des différentes neurotoxines botuliques et leurs sites de clivage.**

| TOXINES       | CIBLES           | SITES DE CLIVAGE   |
|---------------|------------------|--|
| <b>BoNT/A</b> | <b>SNAP25</b>    | <b>Glu-Ala-Asn-Gln<sup>197</sup>/Arg<sup>198</sup>-Ala-Thr-Lys</b> |
| <b>BoNT/B</b> | <b>VAMP</b>      | <b>Glu-Ala-Ser-Gln<sup>76</sup>/Phe<sup>77</sup>-Glu-Thr-Ser</b>   |
| <b>BoNT/C</b> | <b>Syntaxine</b> | <b>Asp-Thr-Lys-Lys<sup>253</sup>/Ala<sup>254</sup>-Val-Lys-Tyr</b> |
| <b>BoNT/C</b> | <b>SNAP25</b>    | <b>Ala-Asn-Gln-Arg<sup>198</sup>/Ala<sup>199</sup>-Thr-Lys-Met</b> |
| <b>BoNT/D</b> | <b>VAMP</b>      | <b>Arg-Asp-Gln-Lys<sup>59</sup>/Leu<sup>60</sup>-Ser-Glu-Leu</b>   |
| <b>BoNT/E</b> | <b>SNAP25</b>    | <b>Gln-Ile-Asp-Arg<sup>180</sup>/Ile<sup>181</sup>-Met-Glu-Lys</b> |
| <b>BoNT/F</b> | <b>VAMP</b>      | <b>Glu-Arg-Asp-Gln<sup>58</sup>/Lys<sup>59</sup>-Leu-Ser-Glu</b>   |
| <b>BoNT/G</b> | <b>VAMP</b>      | <b>Glu-Thr-Ser-Ala<sup>81</sup>/Ala<sup>82</sup>-Lys-Leu-Lys</b>   |



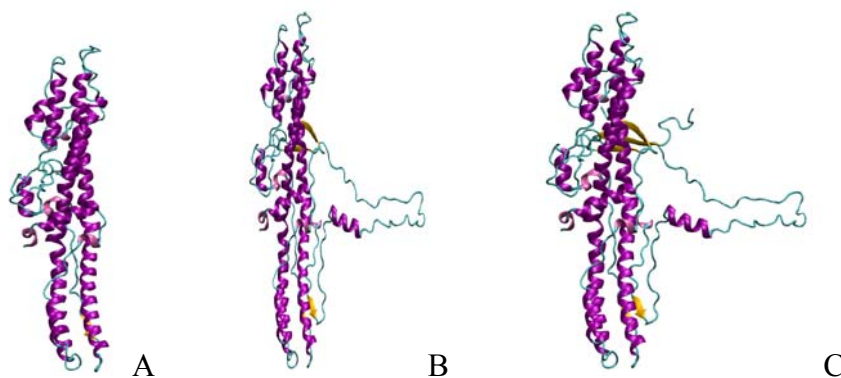
**Figure 12 : Les différentes étapes du processus d'exocytose.** D'après Humeau et al., 2000.

**A.** Les vésicules synaptiques s'accumulent à proximité de la membrane présynaptique. **B et C** Les vésicules synaptiques s'arriment à la membrane présynaptique. La dépolarisation de la membrane plasmique entraîne une entrée massive de  $Ca^{2+}$  qui est capté par la synaptotagmine. Cela induirait un changement de conformation du complexe SNARE : c'est l'étape dite de maturation. La vésicule est alors capable de fusionner avec la membrane présynaptique. (**D1**) et de libérer son contenu dans la fente synaptique. **D2** représente une coupe de la vésicule synaptique au stade D1. Les neurotoxines interagissent avec les SNAREs (VAMP, SNAP25 et synaptotagmine) avant ou pendant l'arrimage de la vésicule synaptique à la membrane. Les neurotoxines ne peuvent pas cliver les SNAREs lorsque le complexe est formé. Cependant, le clivage des SNARE n'empêche pas la formation du complexe SNARE, mais la fusion de la vésicule avec la membrane présynaptique.

#### VI.4 - Le domaine de translocation de la toxine botulique

Le domaine de translocation de la toxine botulique constitue la partie N-terminale ou  $H_N$  de la chaîne lourde. C'est cette partie de la toxine qui jouerait un rôle prépondérant dans le passage de la chaîne légère jusque dans le cytosol. Sa structure est très différente de celle observée pour d'autres toxines dont le mode d'action est similaire et passe par la formation d'un pore pour la translocation du domaine catalytique. Il est constitué de quatre longues hélices  $\alpha$  dont la longueur est d'environ 105 Å (Fig. 13B). Sa séquence et sa structure sont très conservées parmi les neurotoxines clostridiales. La région qui est prédite pour la formation du pore n'est pas une hélice  $\alpha$  et elle est située à la surface de la toxine dans le cas de la BoNT/A (Oblatt-Montal *et al.*, 1995). Une autre de ses particularités provient aussi de la boucle (résidus 492 à 545 dans la BoNT/A) qui entoure le domaine catalytique et probablement ferme partiellement l'accès au site actif du domaine catalytique. Cela laisse raisonnablement supposer que cette boucle, outre son rôle potentiel d'inhibiteur de la métalloprotéase (Brunger *et al.*, 2007) a un rôle à jouer dans la translocation du domaine catalytique vers le cytosol de la cellule cible.

Toutes ces caractéristiques structurales originales du domaine de translocation laissent à penser que le mécanisme d'interaction avec la bicouche lipidique et le mécanisme de formation de pores de cette toxine sont différents de ceux observés jusqu'ici pour les toxines de la même famille (Lalli *et al.*, 2003), (Ménétreay *et al.*, 2005).



**Figure 13: Représentation des trois protéines recombinantes Ts (A), Tm (B) et Tl(C)**  
D'après la structure cristallographique de BoNT/A entière, PDB Id 3BTA.

Nous avons choisi de travailler avec trois « formes » du domaine de translocation de BoNT/A sous forme de protéines recombinantes (Fig. 13). Tm (m pour medium) (Fig. 13B) est la protéine recombinante correspondant au domaine de translocation lorsque

la toxine est « active ». Tl (pour long) (Fig. 13C) est le domaine de translocation lorsque la toxine est encore une chaîne polypeptidique unique et Ts (s pour Short) (Fig. 13A) est le domaine de translocation sans la boucle enserrant le domaine catalytique dans la toxine entière. Ainsi, l'étude de ces protéines permettra de déterminer le mode d'interaction du domaine de translocation avec les membranes lipidiques et les éventuels changements conformationnels nécessaires à cette interaction. Et ce, tout en déterminant le rôle de la boucle enserrant le domaine catalytique dans la neurotoxine entière.

**B - LES MEMBRANES BIOLOGIQUES**

**I – Le modèle de la mosaïque fluide**

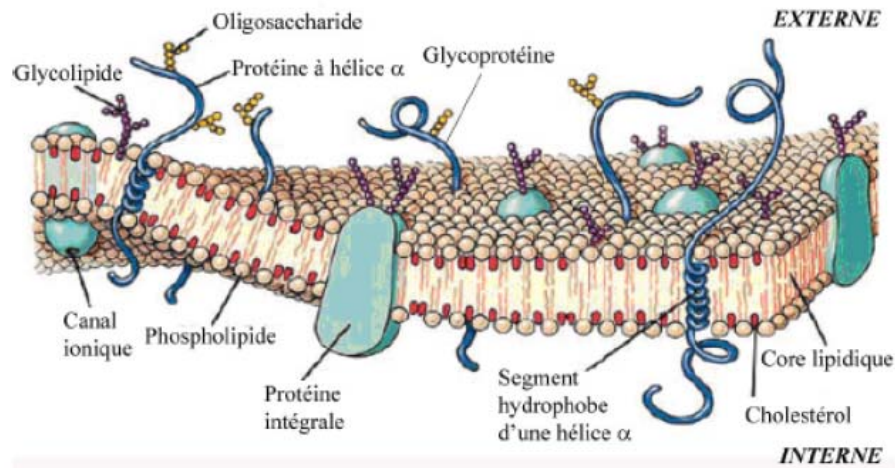
Dans les membranes biologiques les lipides s'organisent en bicouches planes asymétriques dans lesquelles sont incorporées des protéines. Les diverses études réalisées à partir de membranes modèles ont permis de mieux comprendre l'organisation des phospholipides des membranes plasmiques naturelles. Cependant, même si la membrane plasmique des érythrocytes est bien caractérisée, il reste de nombreuses questions concernant l'organisation et le rôle des constituants des membranes plasmiques.

Les membranes plasmiques des eucaryotes jouent de nombreux rôles dans la vie d'une cellule :

- 1) Ce sont des barrières imperméables séparant les milieux externes et internes de la cellule tout en permettant des échanges contrôlés entre les deux compartiments.
- 2) Leur surface externe comporte des sites de reconnaissance spécifiques (oligosaccharides, protéines) assurant la réception de signaux moléculaires de différentes origines.
- 3) Elles contiennent des enzymes, sites d'activité biochimique.
- 4) Elles sont parfois capables d'adapter leur forme, comme dans le cas des globules rouges, ou de résister à des cycles de contraction-relaxation comme dans le cas des cellules musculaires.

La membrane plasmique des cellules eucaryotes est constituée de lipides (phospholipides, glycolipides et cholestérol) et de protéines. Comme toutes les membranes biologiques, elle est globalement organisée comme le modèle de la « mosaïque fluide » proposé par Singer et Nicholson en 1972. Dans ce modèle représenté dans la Figure 14, toute membrane est constituée de deux monocouches ou feuillettes de phospholipides formant la bicouche dans laquelle les chaînes aliphatiques se font face. Les têtes polaires sont orientées vers les phases aqueuses.

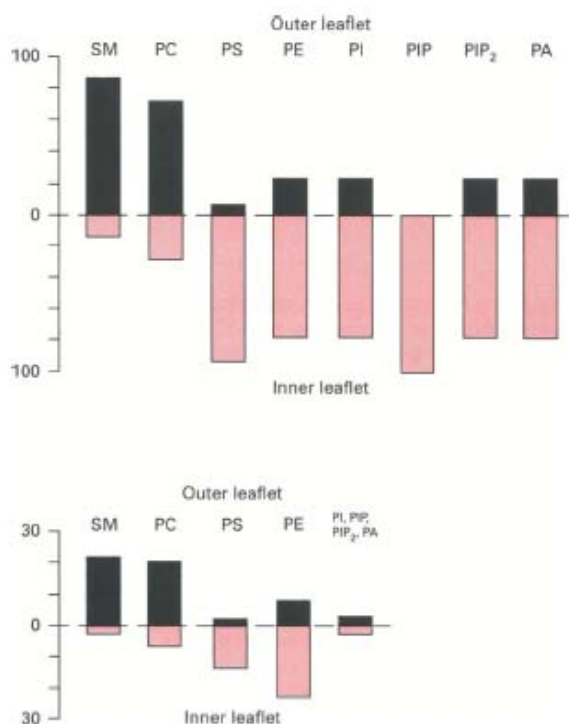




**Figure 14 : Vue schématique de la membrane plasmique d'une cellule eucaryote.** D'après *Biologie moléculaire de la cellule*. 3<sup>ème</sup> édition. Edition Flammarion Médecine-Sciences. Alberts et al., 1989.

Les protéines intégrales ou intrinsèques traversent la membrane. Leurs séquences hydrophobes leur permettent d'être dissoutes dans le cœur hydrophobe de la membrane. Les protéines périphériques sont quant à elles associées à la membrane, par des interactions de faible énergie, établies avec les têtes polaires des lipides ou avec les régions dépassant de la membrane de protéines intrinsèques. Des protéines sont aussi localisées à l'extérieur de la membrane, mais reliées de façon covalente à celle-ci via un glycophosphatidylinositol. La phase lipidique des membranes biologiques est fluide dans les conditions physiologiques et permet donc le déplacement latéral des constituants. Cependant les mouvements peuvent être limités par la formation d'agrégats et/ou d'interaction avec le milieu interne (cytosquelette) ou externe (matrice).

Une autre caractéristique des membranes naturelles est leur asymétrie. Les protéines intrinsèques ne sont pas distribuées de façon symétrique de part et d'autre de la membrane, et les protéines associées à la membrane sont différentes des deux côtés. Il en va de même pour les lipides polaires dont la répartition diffère d'un feuillet à l'autre : on parle d'asymétrie de distribution des lipides (Fig. 15).

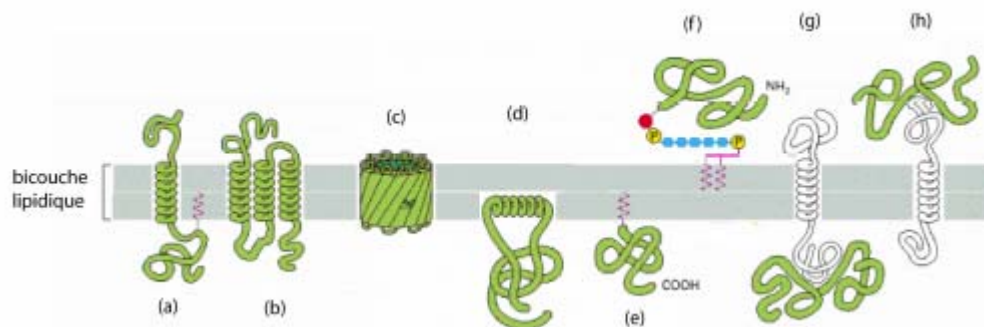


**Figure 15 : Distribution asymétrique des lipides dans les érythrocytes humains.** Haut : distribution des lipides sur chaque feuillet de la membrane en fonction de la répartition de chaque lipide. Bas : La répartition des lipides est donnée en pourcentage de phospholipides totaux. SM : Sphingomyéline ; PC : Phosphatidylcholine ; PS : Phosphatidylsérine ; PE : Phosphatidyléthanolamine ; PI : Phosphatidyinositol ; PIP : Phosphatidylinositol 4-phosphate ; PIP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PA Acide Phosphatidique. D'après Zachowski. 1993.

## II - Les interactions protéines-lipides

### II.1 - Les différents modes d'association des protéines aux membranes

Les interactions entre les protéines et les lipides stabilisent l'ensemble membranaire tout en permettant les mouvements nécessaires à l'activité des protéines. Il existe différents modes d'association des protéines aux membranes. Ceux-ci sont décrits dans la Figure 16. Les protéines intrinsèques pénètrent la bicouche lipidique (Fig. 16a-d). Les protéines extrinsèques sont associées à la membrane et localisées à sa surface (Fig. 16e-h).



**Figure 16 : Les différents modes d'association des protéines aux membranes biologiques.** D'après Alberts et al., *Molecular biology of the cell*, 2002.

Les protéines extrinsèques ou périphériques sont associées à la surface de la membrane grâce à (i) des interactions faibles de type électrostatique avec les têtes polaires des lipides ou une portion hydrophile de protéine intégrale dépassant de la bicouche (Fig. 16g et 16h).

Les protéines extrinsèques ou périphériques sont associées à la surface de la membrane grâce à (i) des interactions faibles de type électrostatique avec les têtes polaires des lipides ou une portion hydrophile de protéine intégrale dépassant de la bicouche (Fig. 16g et 16h).

Les protéines à ancrage membranaire sont liées de façon covalente à la membrane par un acide gras ou une molécule de lipide de la bicouche. Il existe plusieurs types d'ancrage de ce type de protéine à la membrane : myristoylation des glycines N-terminale, palmitoylations, ou isoprénylations sur les cystéines, ancrage par un lipide modifié, le glycoposphatidylinositol (ancre GPI). Une partie des protéines intrinsèques possède également une ancre lipidique de façon à stabiliser l'ensemble (Fig. 16a).

Certaines protéines périphériques et à ancrage peuvent être considérées comme amphitropiques lorsqu'un changement de structure et/ou un détachement de la partie hydrophobe permet de les solubiliser. Ces phénomènes sont régulés par différents paramètres qui seront détaillés plus loin.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement au cas des protéines intrinsèques et amphitropiques.

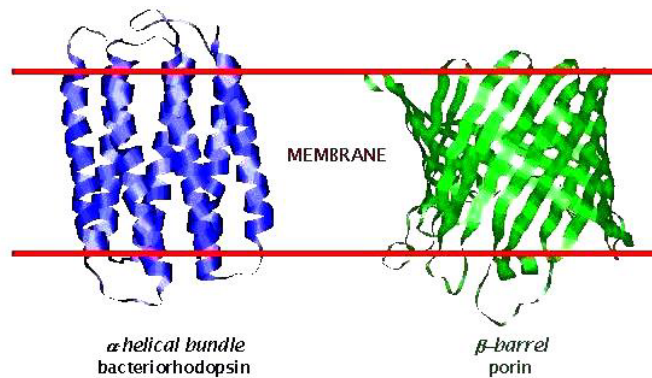
### **II.2 - Les protéines intrinsèques**

Ces protéines sont en interaction et avec le cœur hydrophobe de la membrane et avec l'interface de la membrane (c'est-à-dire la région des têtes polaires). Elles sont soit partiellement insérées dans la membrane soit la traversent complètement. Seulement deux structures de protéines intrinsèques ont été observées jusqu'ici : les structures en tonneau  $\beta$  ou en paquets d'hélices  $\alpha$  (Fig. 17).

Les structures les plus fréquemment rencontrées sont les structures en paquets d'hélices  $\alpha$ . Ainsi les hélices  $\alpha$  transmembranaires représentent la plus grande majorité des structures connues. Cependant toutes les hélices liées à la membrane ne sont pas transmembranaires. Les hélices amphiphiles possèdent, selon leur grand axe, une face hydrophobe et une face hydrophile. Cela leur permet d'ancrer une protéine dans le plan de

la membrane. Les hélices amphiphiles établissent des interactions de type électrostatique avec l'interface de la membrane et des interactions de type hydrophobe avec les chaînes aliphatiques des lipides composant la membrane (Fig. 16d).

Les protéines structurées en tonneau  $\beta$  sont plus rares. Ce type d'organisation est retrouvé notamment chez les porines, filtres moléculaires de la paroi externe des bactéries à Gram-négatif.



*Figure 17 : Représentation des deux principales classes de protéines membranaires. Tiré du site internet [http://blanco.biomol.uci.edu/mp\\_assembly.html](http://blanco.biomol.uci.edu/mp_assembly.html)*

### **II.3 - Les protéines membranaires transitoires : Amphitropisme**

Les protéines amphitropiques sont solubles en milieu aqueux, mais elles sont capables de se lier aux membranes, de façon réversible, sous certaines conditions. Ainsi, les protéines amphitropiques n'appartiennent pas à la famille des protéines cytosoliques, solubles en solvant aqueux, ni à la famille des protéines membranaires. C'est cette double localisation apparente des protéines amphitropiques qui a été nommée amphitropisme (Burn, 1988).

Ce type de protéines est retrouvé chez les eucaryotes et les procaryotes. Elles accomplissent des fonctions biologiques variées. Ainsi les retrouve-t-on impliquées dans les phénomènes d'apoptose (Newmeyer & Ferguson-Miller, 2003), la croissance cellulaire (Wiederkehr *et al.*, 1997), la transduction du signal (Johnson & Cornell, 1999), l'endocytose (Conner & Schmid, 2003), la fusion membranaire (Jahn *et al.*, 2003), ou encore la virulence bactérienne.

La liaison à la membrane est toujours une étape clef dans l'accomplissement de la fonction biologique des protéines amphitropiques. Ainsi, la déstabilisation des membranes ou la fuite ionique des membranes biologiques cibles causées par des peptides antimicrobiens ou des toxines bactériennes nécessitent l'insertion de ces polypeptides dans les membranes (Parker & Feil, 2005).

- ***Mécanisme de liaison à la membrane***

Les mécanismes de liaison aux membranes des protéines amphitropiques sont complexes et impliquent une plus large spécificité qu'une simple interaction protéine-ligand. Dans deux nombreux cas, la liaison à la membrane est un processus à deux étapes : (i) adsorption électrostatique à la surface de la membrane puis (ii) insertion de la protéine dans la bicouche favorisée par un effet hydrophobe (Johnson & Cornell, 1999).

La première étape de la liaison implique des interactions de type dipolaire entre les chaînes latérales des résidus basiques et les têtes polaires anioniques de la bicouche. En effet les membranes biologiques sont composées de 10 à 20% de lipides anioniques. La liaison aux membranes de la plupart des protéines amphitropiques nécessite la présence de lipides anioniques. C'est le cas par exemple de la cytidylyltransférase (Johnson *et al.*, 2003), des protéines de la famille de Bcl-2 (Garcia-Saez *et al.*, 2004), des annexines (Ladokhin *et al.*, 2002) et des toxines bactériennes (Parker & Feil, 2005). Cette première étape d'adsorption électrostatique dépend du nombre de résidus basiques et de leur répartition à la surface de la protéine. Elle est aussi dépendante du pH car la charge des résidus dépend directement de la concentration en protons. La nature des têtes polaires définit aussi la spécificité de la liaison à la membrane (Johnson & Cornell, 1999). Certaines protéines se lient spécifiquement à un type de lipide ; ainsi la protéine kinase C se lie-t-elle préférentiellement aux phosphatidylsérines et la protéine MARCKS aux phosphatidylinositols.

L'étape d'adsorption électrostatique permet de localiser les peptides à la surface de la membrane et de les orienter de façon optimale pour faciliter la seconde étape. La protéine subit ensuite des changements conformationnels conduisant à un état apte à la pénétration dans la membrane. Les protéines amphitropiques possèdent un caractère amphiphile, ainsi en solution elles masquent leurs zones hydrophobes. Ces dernières ne sont exposées au solvant que lors des changements conformationnels conduisant parfois à un état partiellement déplié apte à interagir avec les membranes. Les zones hydrophobes s'insèrent plus ou moins profondément dans la bicouche lipidique selon les protéines. En effet, certaines pénètrent superficiellement dans une seule bicouche alors que d'autres deviennent transmembranaires.

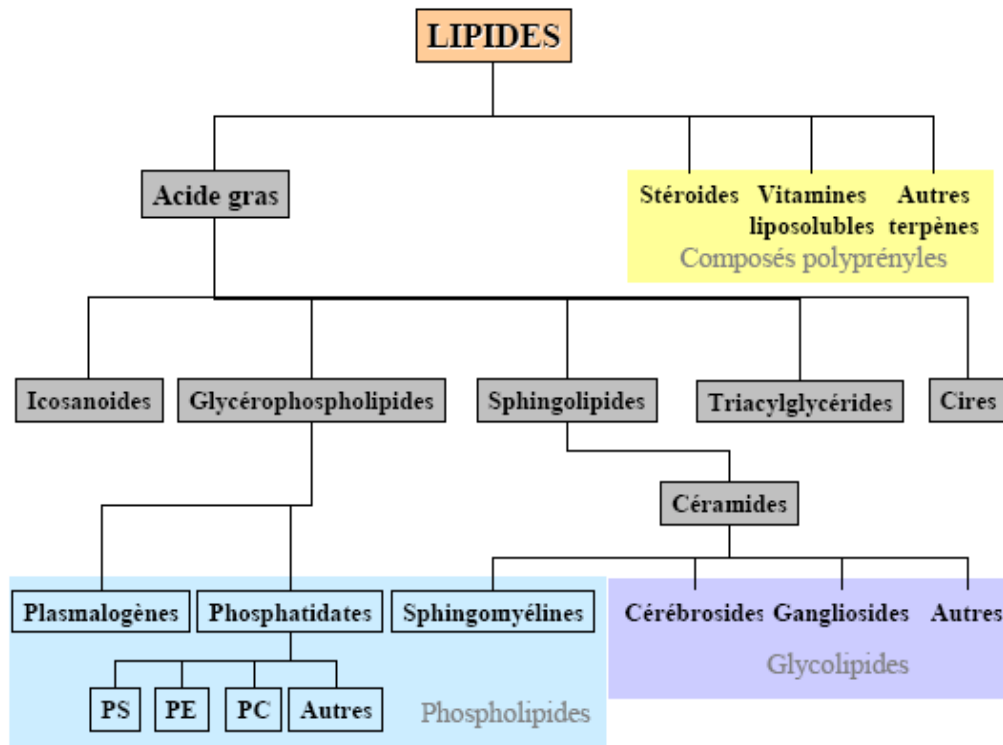
Une fois insérées, les protéines amphitropiques sont stabilisées dans la bicouche par un ensemble d'interactions électrostatiques et hydrophobes, tout comme le sont les protéines membranaires (Heymann *et al.*, 1996). De nombreux travaux se sont attachés à

décrire la structure des protéines amphitropiques liées aux membranes. Ainsi la structure de toxines bactériennes et notamment celles des colicines et de la toxine diphtérique sont très largement décrites dans la littérature. Ces deux protéines forment des pores dans la membrane de la cellule cible. La formation de ces pores est un processus à deux étapes régulé par le pH ou un potentiel de membrane. Ces deux toxines ont une structure composée d'hélices  $\alpha$  et appartiennent à la famille de globine.

Ainsi, les deux étapes impliquent une fine balance entre les interactions de type électrostatique et les forces hydrophobes dont les contributions sont modulées par un échange conformationnel. La contribution de chaque composante peut être mise en évidence en modifiant la force ionique du milieu. Ainsi, une force ionique élevée favorise les interactions hydrophobes au détriment des interactions de type électrostatiques. Inversement une faible force ionique favorise les interactions de type électrostatique. D'autres facteurs régulent l'interaction avec les membranes, en particulier le pH et les propriétés de la bicouche.

### **III - Les lipides**

Dans sa plus large conception un lipide (du grec *lipos* : gras) se définit comme un composé de poids moléculaire inférieur à 5000 Da avec une proportion importante de chaînes hydrocarbonées dans sa structure. Les lipides sont les constituants fondamentaux des membranes biologiques. Il existe de lipides hydrophobes (non polaires) et des lipides amphiphiles (comportant à la fois des groupements polaires et des groupements non polaires). L'architecture des lipides est fondée sur des motifs communs. Cela permet de différencier les composés polyprényles (stéroïdes, vitamines liposolubles par exemple) des lipides comportant des acides gras. Les acides gras sont les lipides les plus simples. Ils sont par ailleurs les composants de nombreux lipides plus complexes (phospholipides, sphingolipides) (Fig. 18).



*Figure 18 : Classification des principaux types de lipides d'après leur parenté structurale. PS : phosphatidylsérine, PE : Phosphatidyléthanolamine, PC : Phosphatidylcholine.*

Les classes de lipides diffèrent non seulement par leur structure mais également par leur fonction biologique. Certains remplissent leur fonction en tant que molécule isolée, d'autres en association avec d'autres molécules (lipoprotéines) ou au sein de complexes et d'agrégats (membranes biologiques).

Dans ce manuscrit seront décrits plus précisément les lipides membranaires ainsi que les acides gras.

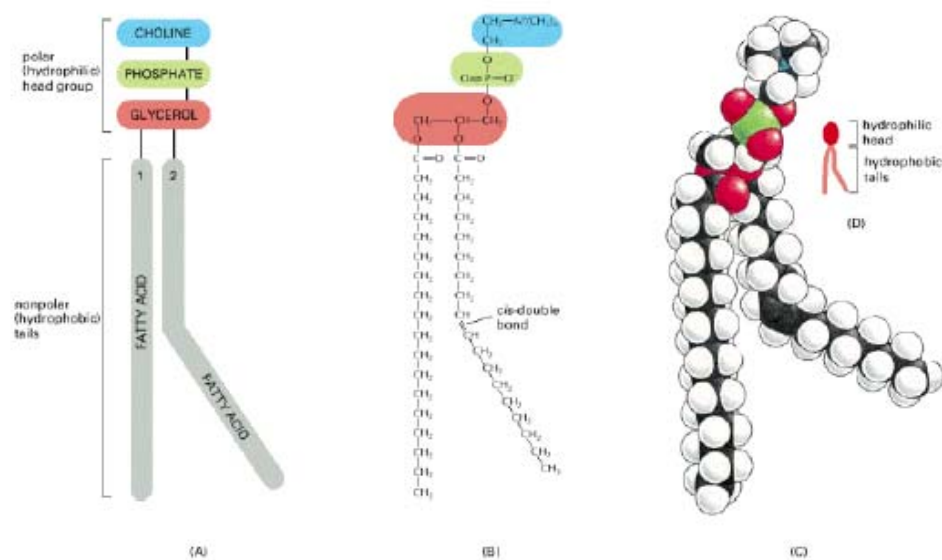
### **III.1 - Les acides gras**

Ils sont constitutifs de nombreux types de lipides. Ils se distinguent par la longueur de la chaîne hydrocarbonée, le degré d'insaturation et la position des doubles liaisons sur la chaîne. (Tableau 2).

| Nombre de C | Nombre d'insaturation | Nom commun   | Abréviation | Nom IUPAC  |
|-------------|-----------------------|--------------|-------------|--|
| 12          | 0                     | Laurate      | C12:0       | Dodecanoate                                      |
| 14          | 0                     | Myristate    | C14:0       | Tétradécanoate                                   |
| 16          | 0                     | Palmitate    | C16:0       | Hexadécanoate                                    |
| 18          | 0                     | Stéarate     | C18:0       | Octadécanoate                                    |
| 20          | 0                     | Arachidate   | C20:0       | Icosanoate                                       |
| 22          | 0                     | Béhénate     | C22:0       | Docosanoate                                      |
| 24          | 0                     | Lignocérate  | C24:0       | Tétracosanoate                                   |
| 16          | 1                     | Palmitoléate | C16:1       | cis- $\Delta^9$ -hexadécenoate                   |
| 18          | 1                     | Oléate       | C18:1       | cis- $\Delta^9$ -octadécenoate                   |
| 18          | 2                     | Linoléate    | C18:2       | cis,cis- $\Delta^{9,12}$ -octadécadiénoate       |
| 18          | 3                     | Linoléate    | C18:3       | tout cis- $\Delta^{9,12,15}$ -octadécatriénoate  |
| 20          | 4                     | Arachidonate | C20:4       | tout cis- $\Delta^{5,8,11,14}$ -icosatétraénoate |

*Tableau 2 : Quelques acides gras les plus représentés dans les membranes plasmique.*

Parmi les acides gras insaturés, la configuration de la double liaison est en général de type *cis*. Ainsi, la présence d'une ou plusieurs insaturations introduit une flexion accentuée de la chaîne par rapport à un acide gras saturé (Fig. 19). Ceci s'oppose à la formation de cristaux compacts et ordonnés et défavorise les interactions de Van der Waals entre chaînes. Les acides gras les plus abondants chez les animaux sont l'oléate (18 :1), le palmitate (16 :0) et le stéarate (18 :0). Mais des acides gras poly-insaturés sont également retrouvés, comme le linoléate (18 :2) et le linoléate (18 :3).



*Figure 19 : Les différentes parties d'une molécule de phosphatidylcholine. (A) représentation schématique. (B) formule chimique. (C) modèle moléculaire et symbole.*



### **III.2 - Les phospholipides**

Les phospholipides sont caractérisés par une partie polaire (le phosphoglycérol substitué) et une partie apolaire (les chaînes hydrocarbonées). Ce sont donc des molécules amphiphiles.

### **III.3 - Les diacylphosphoglycérides**

Ils dérivent de l'estérification en position 3 du glycérol par un dérivé de l'acide phosphorique ( $XPO_4$ ) dont la nature permet de les classer (Fig. 20). Des chaînes d'acides gras sont associées en position 1 et 2 du glycérol par des liaisons esters. Les classes de phospholipides sont définies par la nature du substituant X. Les phospholipides des membranes plasmiques les plus représentés sont, de manière quantitative, la phosphatidylcholine (PC) et les aminophospholipides (phosphatidylsérine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE)) et le phosphatidylinositol (PI). A pH 7, le groupement phosphate porte une charge négative. Il en résulte que les phospholipides dont le groupement X est neutre ou chargé négativement seront anioniques : PI et PS ; et ceux dont le groupement X est neutre ou porte une charge positive sont neutres électriquement ou zwitterioniques comme c'est le cas de PC et PE.

### **III.4 - Les sphingolipides**

Le constituant de base des sphingolipides est le céramide qui résulte de l'amidification de la sphingosine par un acide gras (Fig. 20). On distingue les sphingophospholipides, qui dérivent du sphingolipide par addition sur la fonction alcool d'un dérivé de l'acide phosphorique et les sphingoglycolipides qui résultent de la liaison d'un sucre simple (cérébroside) ou d'un oligosaccharide (ganglioside) sur la fonction alcool du céramide. La sphingomyéline (ajout de choline sur le céramide) est le sphingolipide le plus abondant dans les membranes plasmiques des cellules de mammifères.

Les gangliosides sont impliqués dans la liaison à la membrane plasmique de certaines toxines, dont la toxine botulique. En effet, des études menées sur BoNT/A et BoNT/B montrent qu'ils sont importants au recrutement de la toxine à la membrane plasmique et à son internalisation. (cf. chapitre I de l'introduction §1.1).

### III.5 - Les stéroïdes

Le cholestérol (Fig. 20) est l'unique stérol des membranes plasmiques des mammifères. C'est une molécule amphiphile avec une très petite partie polaire : le groupement hydroxyle, et une partie apolaire constituée des noyaux stéroïdes et de la chaîne latérale. Il s'insère dans la membrane de telle sorte que son cœur hydrophobe est au contact des chaînes d'acides gras des lipides alors que le groupement hydroxyle est situé au niveau des têtes polaires des lipides. Le cholestérol estérifié ne possède plus de partie polaire, on le retrouve essentiellement au sein des protéines plasmatiques.

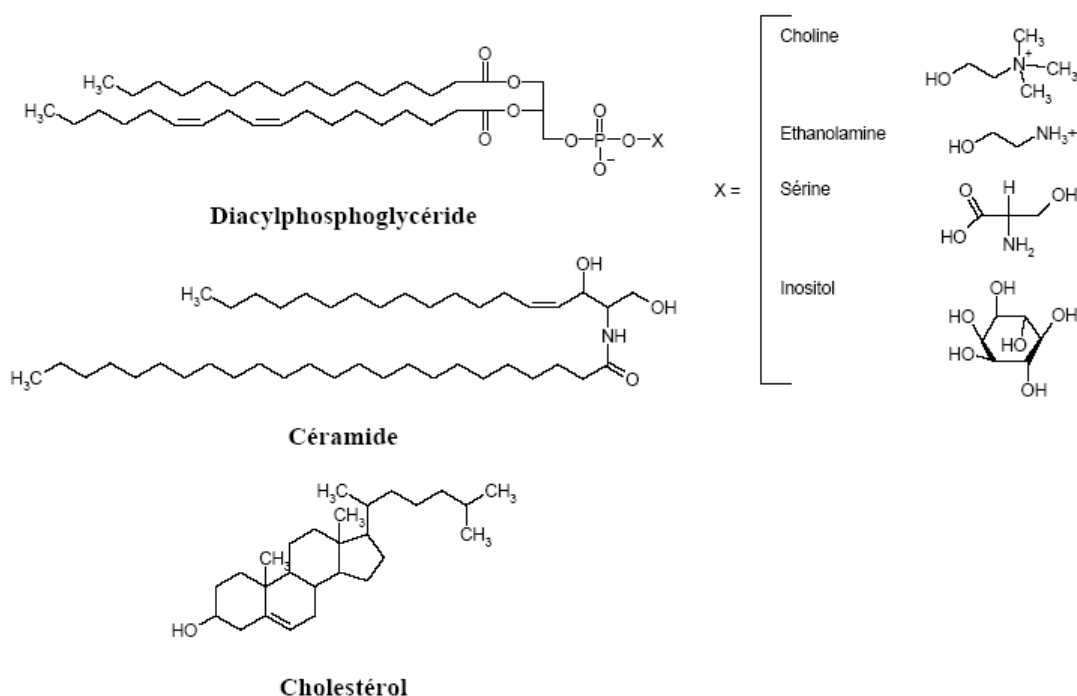


Figure 20 : Formules des principaux lipides des membranes plasmiques

### IV - Polymorphisme physique des lipides dans l'eau

En phase aqueuse, les lipides ont tendance à adopter plusieurs types de phase : c'est ce que l'on appelle le polymorphisme lipidique. Les lipides s'associent de façon à provoquer le maximum d'interactions hydrophobes. Cette capacité dépend non seulement des groupements fonctionnels présents sur le lipide, mais aussi de tous les facteurs influençant les interactions de type dipolaire et électrostatique : pH, force ionique, présence de cations divalents.

#### **IV.1 - Diagramme de phase lipide-eau**

En présence d'eau, les lipides ont tendance à s'associer pour former des structures variées selon la proportion eau/lipide du milieu et la température.

Ainsi, deux types de structures peuvent être déterminées :

Structure de *type I* ou « direct » (huile dans l'eau) où les agrégats lipidiques sont formés dans une phase aqueuse continue.

Structure de *type II* ou « inverse » (eau dans l'huile). Dans ce cas, les têtes polaires hydratées sont organisées au sein d'une matrice non polaire continue constituée de chaînes aliphatiques.

#### **IV.2 - Concentration micellaire critique (cmc)**

En présence d'un excès d'eau, une solution moléculaire de lipides est obtenue, quelle que soit sa nature. Lorsque la concentration en lipides dans l'eau augmente, deux phénomènes différents peuvent se produire, dépendants de la température. Si la température est inférieure à la température de Krafft ( $T_K$ ), les lipides forment des cristaux hydratés qui coexistent avec la phase aqueuse. Au dessus de  $T_K$ , et pour des valeurs supérieures à la concentration micellaire critique (cmc), qui est caractéristique du tensioactif étudié, les lipides vont s'auto-associer sous forme de micelles dont la forme sera plus ou moins sphérique. Il faut noter que dans ce cas, des molécules de la micelle s'échangent rapidement avec les monomères du milieu aqueux. La cmc dépend de la balance hydrophile-lipophile du tensioactif, c'est-à-dire de l'importance relative des régions apolaires et polaires de la molécule. Ainsi la plupart des acides gras ont des cmc de l'ordre de  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ M. Il n'en va pas de même pour les phospholipides membranaires bicaténaires. Par exemple, le dipalmitoylphosphatidylcholine a une cmc de l'ordre de  $10^{-10}$ M. La quantité de lipides sous forme de monomère peut être considérée comme négligeable dans ce cas. Ainsi, les phospholipides membranaires peuvent être considérés comme pratiquement insolubles, la quantité à l'état monomérique étant négligeable. La Figure 21 donne un exemple de diagramme de phase, obtenu pour le SDS. Ce diagramme illustre la dépendance en température et en concentration de l'association du tensio-actif.

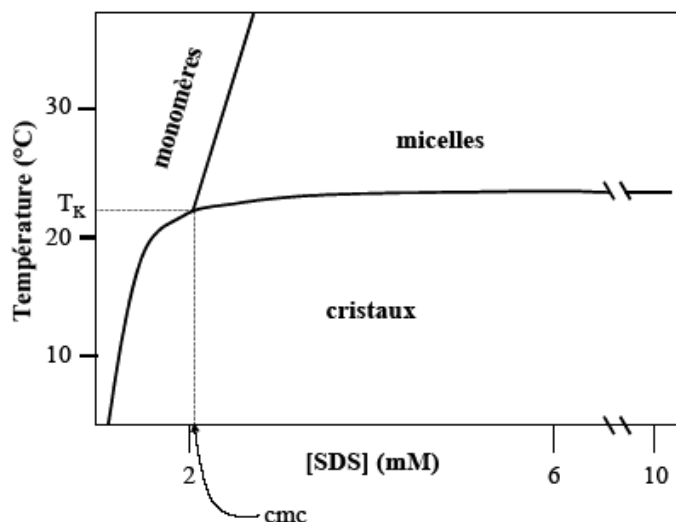


Figure 21 : Diagramme de phase du sodium dodécyl sulfate (SDS).

### IV.3 - Cas des lipides bicaténaires

La Figure 22 montre le diagramme de phase du système modèle DMPC/H<sub>2</sub>O (Janiak *et al.*, 1979). Trois phases sont observables pour ce système : P<sub>β</sub>, L<sub>β</sub> et L<sub>α</sub>. Les deux premières sont présentes à basse température. Elles correspondent à des phases rigides dites phases gel pour lesquelles les chaînes aliphatiques des lipides sont cristallisées dans le plan normal à la membrane. La phase L<sub>α</sub> est une phase fluide appelée liquide-cristalline. Dans ce cas, les chaînes aliphatiques sont désordonnées et les lipides peuvent diffuser latéralement dans le plan. Les bicouches sont alors libres de fluctuer.

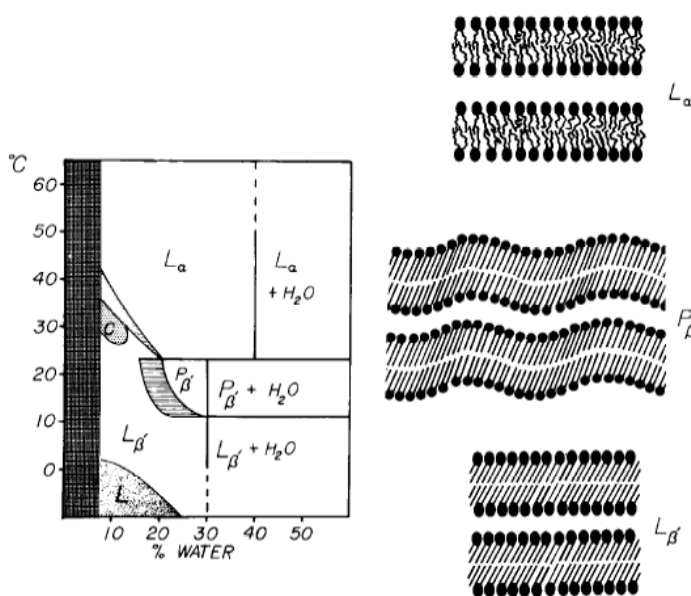


Figure 22 : Représentation du diagramme de phase du système modèle DMPC/H<sub>2</sub>O. D'après Janiak *et al.*, 1979.

La température de fusion d'un lipide ( $T_M$ ) est la température de transition entre la phase gel et la phase  $L\alpha$ . Pour des températures supérieures à  $T_M$  les chaînes carbonées « fondent » : des niveaux d'énergie rotationnelle des liaisons C-C plus élevés sont excités. Dans une bicouche lipidique, les changements d'orientation des chaînes aliphatiques via des configurations gauches et cis des doubles liaisons rendent plus difficiles le parallélisme des chaînes hydrocarbonées. L'agencement des lipides dans une phase gel est donc plus difficile et le désordre moléculaire augmente. Les lipides forment alors un liquide bidimensionnel dans lequel les chaînes aliphatiques sont désordonnées mais en moyenne restent dans le plan de la normale à la membrane.  $T_M$  dépend essentiellement du nombre d'insaturations et de la longueur de la chaîne hydrocarbonée. A longueur de chaîne égale, la fluidité de la membrane augmente avec le nombre d'insaturations. A nombre d'insaturation égal, la fluidité membranaire est inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne.

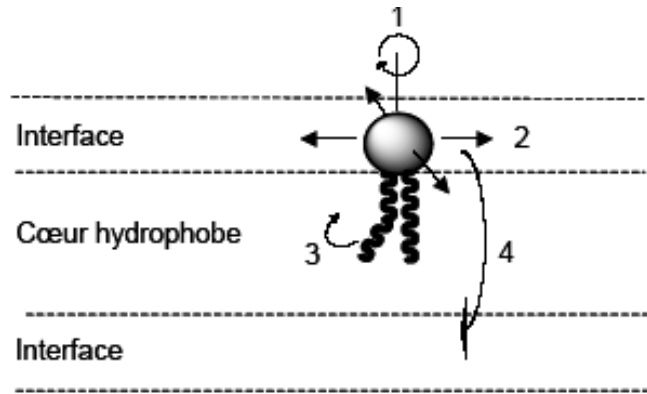
## **V - La membrane**

### **V.1 - Mouvements des lipides au sein de la membrane**

La phase  $L\alpha$  décrite sur des systèmes modèles (Fig. 22) est la phase la plus représentative des membranes biologiques. Au niveau moléculaire, bien que les différents composants des membranes soient confinés dans des espaces bidimensionnels, leurs mouvements n'en restent pas moins divers. Et les mouvements à petite ou plus grande échelle donnent à la membrane sa fluidité. Cette caractéristique est décrite dans le modèle de Singer et Nicholson (Singer & Nicholson, 1972). Tous les éléments constitutifs de la membrane composent une mosaïque fluide dont la mobilité des éléments leur permet d'interagir de manière plus ou moins transitoire.

La viscosité, unité inverse de la fluidité, représente la résistance au déplacement. Dans une membrane, la viscosité moyenne est de l'ordre de  $10^{-1} \text{N.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ , soit cent fois la viscosité de l'eau pure. Cependant, les membranes sont des milieux anisotropes dans lesquels la résistance aux mouvements n'est pas la même dans toutes les directions et régions de la membrane.

Les mouvements locaux conférant aux bicouches lipidiques leur fluidité sont illustrés dans la Figure 23.



**Figure 23 : mouvements des phospholipides dans une membrane. 1 rotation ; 2 diffusion latérale ; 3 mouvements des chaînes acyles ; 4 flip-flop.**

Ainsi, les lipides se déplacent perpétuellement dans le plan de la membrane et tournent sur leur axe (Fig. 23). Les chaînes aliphatiques sont aussi animées d'un mouvement de balancier. Tous ces mouvements sont très rapides. La mesure du coefficient de diffusion latérale ( $D_L$ ) donne des renseignements précis sur cette dynamique. La mesure de  $D_L$  est effectuée par FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) sur des systèmes modèles ou sur cellule entière possédant une lipide ou une protéine greffée d'un marqueur fluorescent. Les coefficients de diffusion sont de l'ordre de  $10^{-12} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  pour un lipide, ce qui correspond à un balayage d'une zone d'environ  $1 \mu\text{m}^2$  en une seconde pour la molécule. Toute la dynamique lipidique favorise la mobilité des protéines membranaires malgré une constante de diffusion de translation latérale 1000 fois inférieure à celle des lipides (Lenaz, 1987). Cependant, ce coefficient est dépendant de la taille des molécules, il en découle une mobilité presque inexistante pour les gros complexes protéiques.

La diffusion transversale (Fig. 23) des lipides (flip-flop) est beaucoup plus lente que la diffusion latérale. La translocation spontanée d'une face à l'autre d'un lipide nécessite un temps de demi-réaction ( $t_{1/2}$ ) de 5h pour une molécule de phosphatidylcholine (Bai & Pagano, 1997). Le passage à travers la membrane plasmique est fortement dépendant de la taille et de la charge de la tête polaire qui doit traverser le cœur hydrophobe de la bicouche lipidique. Le flip-flop est assisté par des enzymes : les flippases qui catalysent la diffusion facilitée des lipides et jouent le rôle de transporteurs membranaires. Ainsi, la vitesse de transport est beaucoup plus rapide avec un  $t_{1/2}$  de l'ordre de quelques minutes pour la phosphatidylcholine (van den Basselaar *et al.*, 1978). Il existe également un transport de certains lipides contre un gradient de concentration (aminophospholipide translocase). L'activité de translocation est aussi très active dans le réticulum endoplasmique pour les N-glycosylations et la formation de

glycosylphosphatidylinositols. Les précurseurs lipidiques sont synthétisés sur la face cytosolique et sont transportés sur la face luminale pour la synthèse finale (Helenius & Aebi, 2001) (Maeda *et al.*, 2001).

### **V.2 - Les domaines lipidiques**

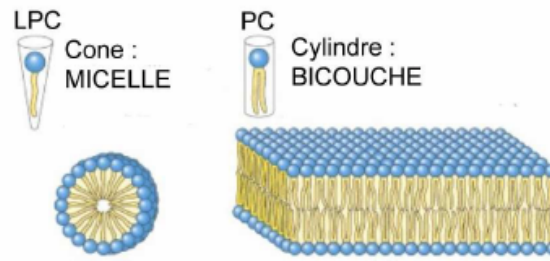
La fluidité et la diffusion des lipides membranaires ne sont pas homogènes. Ainsi, existe-t-il des domaines lipidiques composées de lipides saturés tels que des sphingolipides et de cholestérol. Ces derniers peuvent se rassembler étroitement grâce à des interactions non covalentes et former de véritables domaines lipidiques appelés radeaux lipidiques ou rafts. Ils forment un ensemble membranaire dans une phase liquide-ordonnée. Cet état possède un empilement des chaînes acyles tout comme en phase gel, bien que les mouvements de diffusion latérale restent rapides. Cet ensemble est insoluble aux détergents et « flotte » littéralement à la surface membranaire. Le rassemblement des sphingolipides à longues chaînes affecte l'épaisseur de la membrane : la monocouche grossit localement de 6 Å sur une section membranaire pouvant aller jusqu'à 1 µm. (Sprong *et al.*, 2001). Cette modification locale de l'épaisseur membranaire permet le recrutement de certaines protéines membranaires. La ségrégation lipidique et protéique au sein de ces domaines lipidiques serait impliquée dans la transduction du signal et le trafic membranaire. (Anderson & Jacobson, 2002) (Lucero & Robbins, 2004).

### **V.3 - Polymorphisme lipidique au sein de la membrane**

Bien que les membranes biologiques soient organisées en bicouches planes, certains de leurs composants lipidiques sont capables de former spontanément des assemblages non lamellaires. Ces structures intermédiaires sont observées transitoirement.

Ainsi, la structure de l'assemblage dépend essentiellement de la forme moléculaire des lipides qui la composent. La notion de forme de la molécule lipidique repose sur l'importance relative du volume occupé par la partie hydrophobe par rapport à la partie hydrophile et permet de prévoir quel type d'organisation un lipide adoptera dans l'eau (Cullis & de Kruijff, 1979). Le volume de la tête polaire dépend des atomes qui la composent, de son hydratation ainsi que de sa mobilité. Le volume de la partie hydrophobe d'un lipide est dépendant du nombre d'insaturations en conformation *cis* : plus elles sont nombreuses et proches de la tête polaire du lipide et plus le volume de la partie hydrophobe

de celui-ci sera important. Ainsi, la lysophosphatidylcholine (LPC) qui ne possède qu'une seule chaîne acyle saturée s'organisera en micelle en solvant aqueux, alors que la phosphatidylcholine (PC) s'organisera en bicouche (Fig. 24).



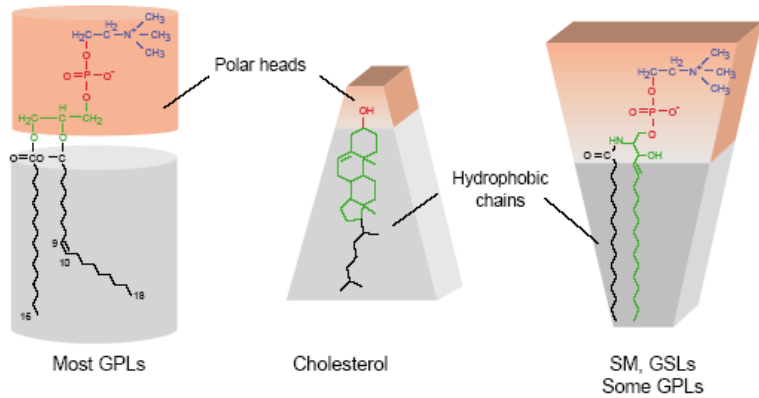
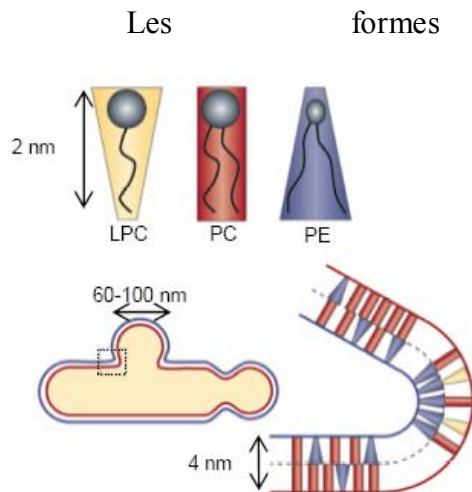
**Figure 24 : Auto-organisation de la lysophosphatidylcholine (LPC) et de la phosphatidylcholine (PC).** Extrait de Cooper GM., *The cell- A molecular approach*, 2000.

De manière générale, un lipide en forme de cône induit une courbure positive (type micelle) et un lipide en forme de cône inversé (comme la phosphatidyléthanolamine) induit une courbure négative (micelle inversée) (de Kruijff, 1997). Ces différentes organisations peuvent avoir un intérêt physiologique transitoire ou durable (Zimmerberg, 2000). Ainsi, chaque organe possède sa propre courbure de membrane régulée par la composition lipidique. Les organisations non lamellaires sont impliquées dans différents processus biologiques fondamentaux, tels que la synthèse membranaire, le trafic intracellulaire, la division cellulaire, l'infection des cellules par des virus à enveloppe ou encore les phénomènes d'exocytose et d'endocytose.

La Figure 25 illustre l'adaptation locale de la composition lipidique lors d'un phénomène de formation ou de fusion de vésicules. Dans ce cas, la présence de phosphatidyléthanolamine sur le feuillet interne de la membrane permet de créer une invagination. Cependant, les phénomènes de fusion membranaire sont étroitement contrôlés *in vivo* par les protéines fusogènes. Ainsi, les protéines SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) sont les acteurs majeurs de la reconnaissance et de la fusion de diverses vésicules de transport (Hong, 2005). Elles sont aussi la cible des neurotoxines clostridiales dont l'effet est d'inhiber la libération de neurotransmetteur grâce au clivage spécifique de certaines SNAREs (cf. Introduction Chap.I §4.3).



**Figure 25 : Polymorphisme lipidique.** L'organisation des lipides entre eux se fait de manière à favoriser les interactions de type hydrophobes. D'après Fantini et al., 2002.



individuelles des lipides jouent un rôle localement sur la stabilisation des protéines insérées dans la bicouche. La présence d'un lipide dans une membrane possédant une courbure différente de la sienne engendrera un stress de courbure. Ce stress va exercer une influence sur la stabilité du système et les interactions avec les protéines membranaires. Mais il est important de noter que les peptides et protéines insérés dans les membranes sont eux aussi

responsables de l'organisation membranaire locale.

#### V.4 - Potentiel de membrane, constante diélectrique

La membrane constitue un environnement amphiphile : hydrophile au niveau des têtes polaires des lipides et hydrophobe dans la région composée par les chaînes aliphatiques. Elle peut être divisée en trois compartiments de constantes diélectriques différentes. Ainsi, La région des têtes polaires a une constante diélectrique comprise entre 20 et 50 ; la constante diélectrique du cœur hydrophobe est généralement comprise entre 2 et 4. La constante diélectrique de l'eau est 78,5. Ainsi, ces différentes valeurs indiquent-elles un changement des propriétés électriques dans l'environnement de la membrane. Cela indique une diminution de la polarité du milieu comparativement à l'eau.

## **VI - Influence des propriétés physiques de la bicouche lipidique sur l'activité et la structure des protéines**

L'influence des lipides sur la stabilité des protéines insérées est généralement basée sur l'étude des protéines membranaires constitutives. Cependant nous considérons que les protéines amphitropiques sont affectées de manière identique par le milieu membranaire. Ainsi donc, une protéine membranaire transitoire ou constitutive sera considérée de la même façon.

La bicouche lipidique induit des contraintes physiques sur les protéines membranaires, il en résulte une limitation dans l'exploration de l'espace conformationnel de celles-ci. Lorsque elles sont insérées dans les membranes, les protéines sont confinées dans un espace à deux dimensions. Cet espace oriente et structure la chaîne polypeptidique en fonction des interactions établies avec les lipides membranaires.

### **VI.1 - Influence des têtes polaires**

La région de l'interface membranaire contient les têtes polaires, parties chargées des lipides. C'est une région importante de la membrane dont le rôle est de moduler un grand nombre de réactions. La diversité chimique de l'interface membranaire offre de nombreuses possibilités d'interactions avec les polypeptides. Ces interactions sont dépendantes de la taille et de la charge des groupements chimiques présents.

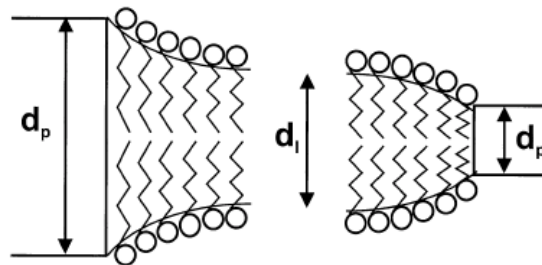
Les têtes polaires créent un réseau bidimensionnel de liaisons hydrogène entre elles et les molécules d'eau. D'autre part, les membranes biologiques contiennent entre 10% et 20% de lipides anioniques. Cela contribue à la création d'un potentiel de surface. Ainsi, les têtes polaires anioniques établissent des interactions électrostatiques répulsives entre elles. Enfin, la faible constante diélectrique ( $\sim 30$ ) renforce les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène entre les lipides anioniques et les protéines.

Le potentiel de membrane créé par les têtes polaires anioniques conduit au recrutement de contre-ions positifs. Cela a pour conséquence l'augmentation de la force ionique à proximité de la surface de la membrane. On retrouve des protons parmi ces cations. Il en résulte une augmentation locale de leur concentration et donc une acidification du pH local de 1 à 2 unités pouvant s'étendre sur une distance de 5 à 15 Å de la surface (Bychkova *et al.*, 1996) (Prats *et al.*, 1989).

La stabilité des protéines est aussi sensible à d'autres facteurs environnementaux que sont la force ionique et l'interface de la membrane. Ainsi, pour certaines protéines comme la toxine diphtérique, l'augmentation de l'acidité déstabilise la structure de la protéine et favorise ainsi son insertion dans la bicouche lipidique.

## **VI.2 - L'épaisseur de la bicouche**

L'épaisseur de la membrane est en moyenne de 5 nm. Le cœur hydrophobe de la bicouche doit recouvrir les segments transmembranaires de protéines membranaires. Son épaisseur est d'environ 2,5-3 nm. L'épaisseur du cœur hydrophobe de la bicouche lipidique est dépendante de sa composition. Elle dépend de la longueur des chaînes aliphatiques des lipides composant la membrane. L'activité de protéines membranaires reconstituées a montré une dépendance en fonction de la longueur des chaînes acyles (Lee, 2003). Ainsi, un mauvais ajustement entre l'épaisseur du cœur hydrophobe de la membrane et celle du segment transmembranaire conduit à une adaptation de l'épaisseur de la bicouche lipidique à proximité de la membrane (Fattal & Ben-Shaul, 1993). Ce phénomène est illustré dans la Figure 26.



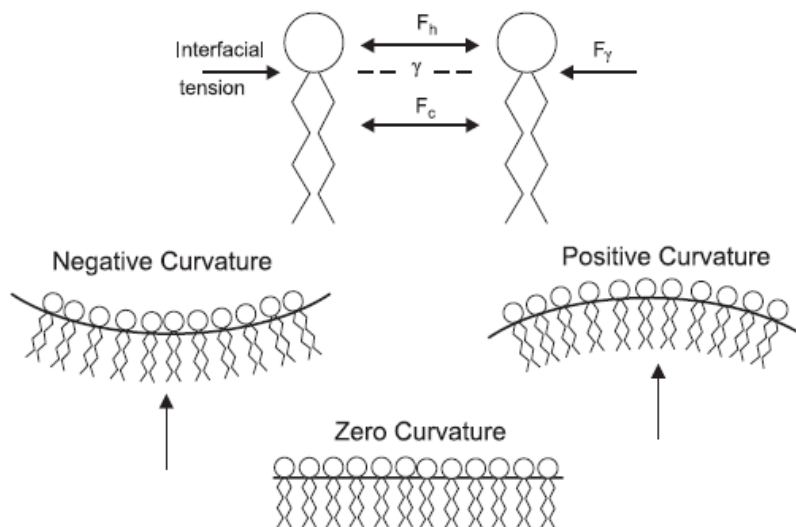
**Figure 26 : Exemples de mésappariements hydrophobes entre une protéine membranaire et la bicouche lipidique.**  $d_p$  et  $d_l$  représentent respectivement l'épaisseur du segment hydrophobe de la protéine et celle du cœur hydrophobe de la membrane. Lorsque  $d_p > d_l$  la bicouche s'étire à proximité de la protéine et les lipides ont une aire moléculaire moindre à proximité de la protéine. Dans le cas où  $d_p < d_l$ , la bicouche se comprime à proximité de la protéine et les lipides occupent une plus grande surface. D'après Lee, 2003.

### VI.3 - La viscosité membranaire

Les forces de friction dans le milieu membranaire s'opposent aux mouvements de grande amplitude des protéines. Or, les protéines membranaires sont amenées à subir des changements conformationnels par exemple pour assurer leurs fonctions enzymatiques. Dans un milieu visqueux, les forces de friction s'y opposent. La viscosité d'un milieu influe donc sur la barrière énergétique entre deux états conformationnels. Plus la viscosité augmente et plus cette barrière énergétique est grande. Une composition lipidique, une température différentes auront donc un effet non négligeable sur l'activité et les changements conformationnels d'une protéine.

### VI.4 - Effets de la courbure membranaire.

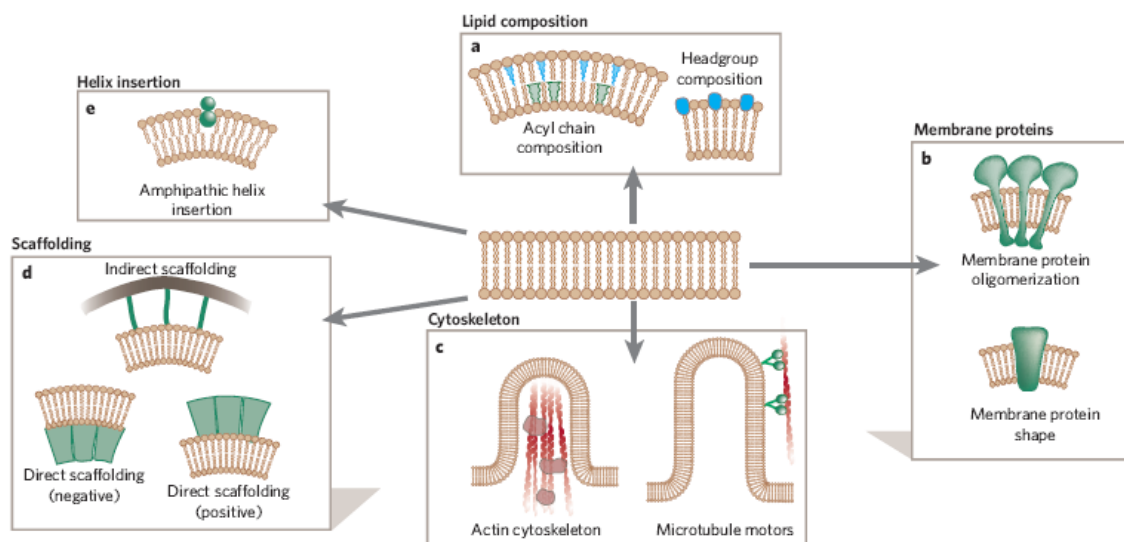
Beaucoup de lipides membranaires préfèrent un assemblage non lamellaire (Rietveld *et al.*, 1993). La présence de ces lipides dans la bicouche induit une courbure. La structure lamellaire de la bicouche est maintenue par un jeu d'interactions attractives et répulsives (Fig. 27).



**Figure 27 : Courbure spontanée de la bicouche lipidique.** Le schéma du haut montre les pressions latérales et tensions s'exerçant dans une monocouche. La tension interfaciale  $F_\gamma$  tend à minimiser l'aire moléculaire.  $F_h$  est la pression latérale s'exerçant dans la région des têtes polaires, due essentiellement à des interactions de type électrostatique répulsives ou attractives.  $F_c$  représente les forces agissant au niveau des chaînes acyles des lipides. Elles sont dues à l'agitation thermique et sont répulsives. Les interactions de Van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées sont attractives. Dans les trois schémas représentant des monocouches, les différents types de courbure sont représentés. Les flèches indiquent la direction de l'observation utilisée pour définir une courbure négative ou positive. Les courbures surviennent en réponse à un déséquilibre dans les différentes pressions exercées sur les lipides dans une monocouche. D'après Lee, 2004.

De façon générale, l'insertion d'une protéine dans la membrane a pour effet stabiliser sa structure en bicouche. Cependant, lorsque l'insertion provoque un mésappariement hydrophobe nécessitant une adaptation de la bicouche lipidique, il se crée une courbure membranaire (positive ou négative) (Fig. 28b et e).

La Figure 28 illustre cinq possibilités d'induire une courbure membranaire. Dans le premier cas (Fig. 28a), ce sont les lipides eux-mêmes qui induisent la courbure. Outre l'asymétrie de distribution des lipides dans la bicouche (Zachowski, 1993), les propriétés des chaînes acyles (longueur, nombre d'insaturations) et la taille des têtes polaires de certains lipides influent sur la courbure de la membrane. Ainsi, un acide phosphatidique et un acide lysophosphatidique vont engendrer respectivement une courbure négative et une courbure positive. Une phosphatidylcholine n'engendrera pas de courbure de la bicouche lipidique car sa tête polaire a une section comparable à celle occupée par ses deux chaînes acyles (Fig. 25). Dans les autres cas de figure, c'est l'interaction ou l'insertion de protéines dans la bicouche lipidique qui provoque une courbure de celle-ci. Ainsi, la forme des protéines intrinsèques peut conduire à une adaptation de la courbure locale de la membrane comme c'est le cas par exemple, du domaine transmembranaire du récepteur à l'acétylcholine de forme conique (Unwin, 2005). L'oligomérisation des protéines membranaires peut également causer ce phénomène (Fig. 28b).



**Figure 28 : Les différents mécanismes de déformation de la membrane : a changements de la composition lipidique. b influence de protéines membranaires qui ont une courbure intrinsèque ou dont l'oligomérisation provoque la courbure. c polymérisation différente du cytosquelette. d « tuteurs » agissant directement ou non sur la courbure de la membrane. e insertion d'une hélice amphiphile dans un seuil feuillet de la membrane. D'après McMahon & Gallop, 2005.**

L'assemblage et le désassemblage du cytosquelette sont également très étroitement liés aux phénomènes de déformation des membranes (Fig. 28c), particulièrement, dans les

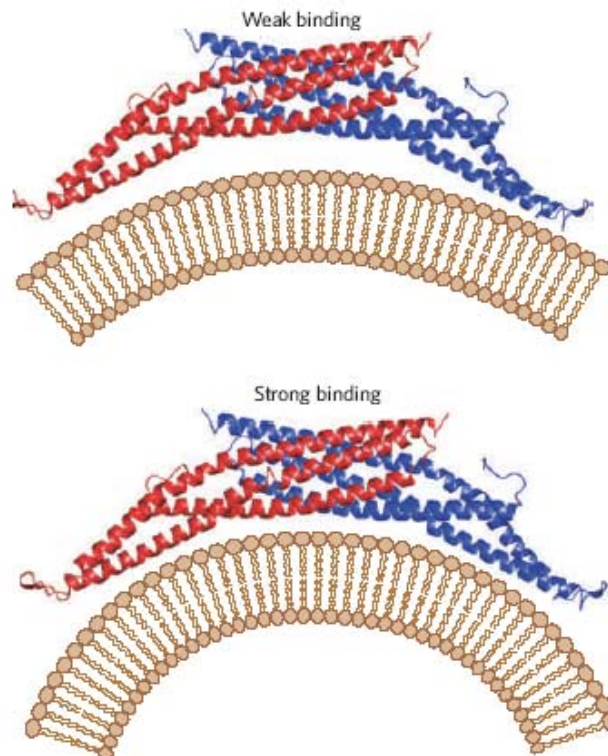
déformations membranaires impliquées dans la motilité des cellules ou dans la formation des vésicules de transport nécessitant la création de régions à très forte courbure (Bretscher, 1996), (Buss *et al.*, 2002).

D'autres familles de protéines agissent véritablement comme des « tuteurs » sur la membrane lui imposant une courbure à leur contact direct ou par un intermédiaire (Fig. 28d). Les protéines de la famille de la dynamine interagissent avec les inositols des lipides et forment des oligomères hélicoïdaux contraignant la topologie de la membrane (Hinshaw *et al.*, 1995), (Marks *et al.*, 2001). L'effet de ce type de protéines sur les membranes peut être comparé à celui d'un exosquelette, soutenant et sculptant celle-ci. Les protéines appartenant aux manteaux protéiques recouvrant certaines vésicules de transport peuvent également être considérées comme étant des « exosquelettes » modelant la forme des membranes (clathrine, COPI). Cependant dans ce cas, ce n'est pas directement une seule protéine ou son oligomérisation, mais l'assemblage de différentes protéines qui conduit à la déformation de la membrane (Antonny *et al.*, 2003), (Nossal, 2001).

Dans le dernier cas de figure présenté dans la Figure 28e, c'est l'insertion d'hélices amphiphiles dans la membrane qui résulte en l'augmentation locale de la courbure (positive dans ce cas). Ce type d'hélice possède une face hydrophobe et une face polaire, il est notamment retrouvé dans des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire, telles que les petites protéines G, les epsines et les protéines contenant des domaines BAR (Bin/Amphiphysine/Rvs). L'insertion asymétrique de ces hélices amphiphiles dans la membrane déstabilise tout d'abord un seul feuillet de la membrane puis, la bicouche lipidique se réarrange pour optimiser les interactions avec l'hélice insérée mais également entre lipides.

D'autres protéines dont la fonction les amène à interagir avec les membranes sont sensibles à la courbure de ces dernières. Ainsi, l'interaction de protéines possédant des domaines BAR est elle sensible à la courbure de la membrane. Les domaines BAR sont des domaines très conservés que l'on retrouve dans plusieurs protéines telles que l'annexine B12 (Fischer *et al.*, 2007) et ArfGAP1 (Bigay *et al.*, 2005), les amphiphysines et les endophilines. Les domaines BAR de ces deux dernières conduisent à la formation de tubes lors de l'interaction avec les membranes *in vitro* (Peter *et al.*, 2004) (Farsad *et al.*, 2001) (Richnau *et al.*, 2004). Les protéines de la superfamille BAR se lient aux membranes, sous forme de dimères, avec une spécificité de courbure (Fig. 29). Cette propriété est très certainement due à la courbure intrinsèque de la protéine. Ainsi, une courbure de

membrane qui correspond mieux à celle de la protéine favorise les interactions de type électrostatique entre les lipides et les acides aminés chargés de la protéine : l'interaction protéine-membrane est donc plus forte.



**Figure 29 : Domaines BAR de l'amphiphysine en interaction avec une membrane de faible rayon de courbure (haut) et de plus forte courbure (bas). Le domaine BAR établit des interactions plus fortes avec la membrane ayant la plus forte courbure car toute la surface du dimère est en contact avec les lipides et peut ainsi établir un plus grand nombre d'interactions de type électrostatique avec**

Ainsi, l'interaction et/ou l'insertion de protéines dans la membrane induisent-elles des déformations de celle-ci nécessaires au trafic intracellulaire ou à la motilité de la cellule par exemple. Mais la courbure de la membrane est également un préalable à l'interaction avec certaines protéines régulant ainsi leur fonction.

Lors de l'interaction d'une protéine avec la membrane, ce sont donc un grand nombre de facteurs qui entrent en jeu. Si pour certaines protéines, le pH et la charge globale de la membrane sont des facteurs prépondérants dans l'interaction avec la bicouche lipidique, pour d'autres, cette interaction est également modulée par la courbure de la membrane.

## **VII - Les systèmes modèles lipidiques**

Les membranes artificielles sont des systèmes modèles essentiellement composées de phospholipides. Elles sont utilisées (i) pour étudier les caractéristiques structurales et physico-chimiques d'une membrane lipidique (ii) mais elles sont aussi très largement utilisées dans le cadre de l'étude d'interactions protéine-membrane ou de l'activité de transporteurs protéiques.

Les vésicules lipidiques sont les modèles les plus couramment utilisés. Leurs champs d'applications sont très diversifiés, allant de la biochimie à la cosmétologie en passant par la biophysique et la pharmacologie. Ces vésicules sont constituées d'une bicouche (Fig. 30A) dont la composition lipidique et la taille sont contrôlées. Elles isolent le milieu interne du milieu externe.

De toutes les méthodes de préparation des vésicules lipidiques, la plus simple consiste en l'évaporation du solvant organique dans lequel les lipides sont dissous. Le film lipidique ainsi obtenu est resuspendu dans un solvant aqueux par agitation. Les lipides s'organisent alors en vésicules multilamellaires (MLVs pour MultiLamellar Vesicles) (Fig. 30B). Les MLVs sont des vésicules lipidiques comprenant plusieurs bicouches lipidiques concentriques et de tailles hétérogènes. Ces propriétés font des MLVs des objets très peu utilisés pour les études biophysiques. En effet, elles diffusent fortement la lumière, ce qui rend difficile les études par spectroscopie optique. D'autre part, leur hétérogénéité en taille dans une même préparation et d'une préparation à l'autre, influe grandement sur la reproductibilité des résultats. C'est pourquoi les vésicules unilamellaires sont plus utilisées.

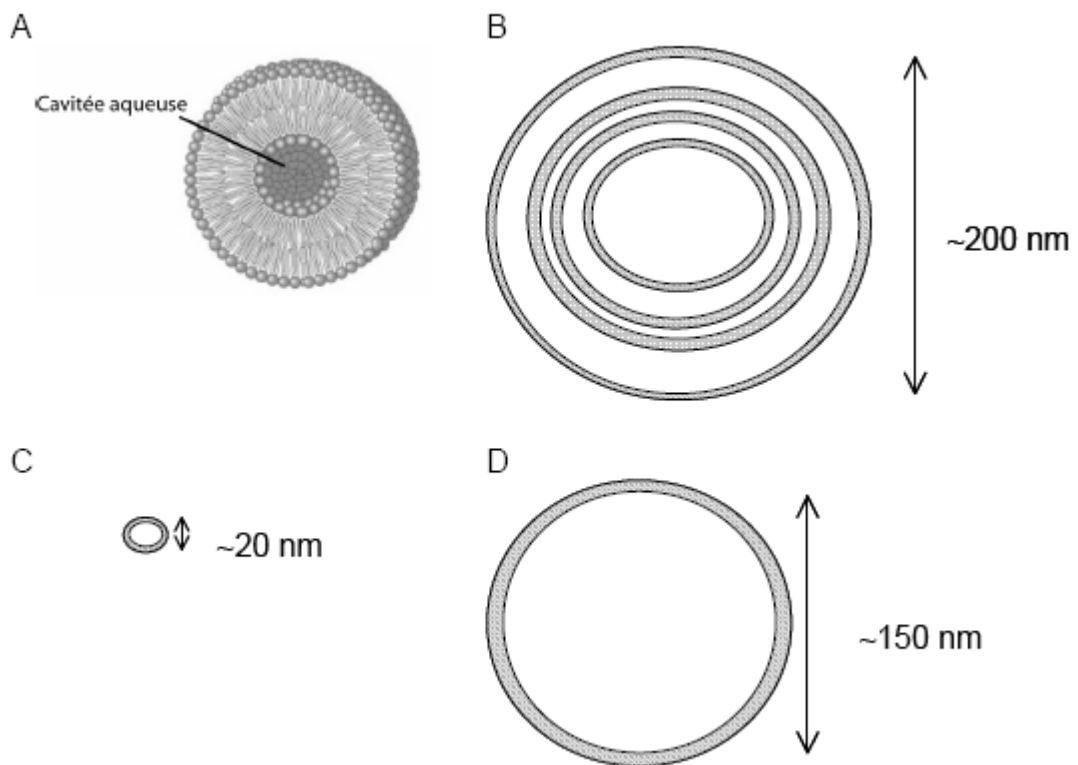
Les vésicules unilamellaires de petite taille (SUVs pour Small Unilamellar Vesicles) (Fig. 30C) sont obtenues par un traitement physique des MLVs (ultrasons). Ce type de vésicule a un diamètre compris entre 15 et 50 nm et ont un faible volume interne. La forte courbure imposée à la membrane impose que le feuillet externe ait une surface significativement supérieure à celle du feuillet interne, donc un nombre de lipides supérieur. La petite taille des SUVs en fait des objets facilement utilisés en spectroscopie optique.



Les vésicules unilamellaires de grande taille (LUVs pour Large Unilamellar Vesicles) (Fig. 30D) sont aussi très largement utilisées pour l'étude d'interactions protéines-membranes. La technique la plus simple de préparation des LUVs est celle que nous avons utilisée : l'évaporation par inversion de phase (Rigaud *et al.*, 1983). Cette méthode consiste à forcer par sonication l'émulsion d'une phase éther, dans laquelle les lipides sont solubles, avec une phase aqueuse. L'éther est ensuite lentement éliminé par évaporation sous pression réduite. Au fur et à mesure de l'évaporation de l'éther, les lipides se réorganisent de façon à favoriser les interactions entre leurs chaînes hydrocarbonées et l'éther. La structure prend une allure de gel qui se liquéfie lors de l'élimination totale de l'éther. Lorsque l'éther est totalement éliminé des MLVs sont formées et leur taille est comprise entre 0,2  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$ . Des passages consécutifs sur un extrudeur équipé d'un filtre dont les pores ont un diamètre défini, vont casser les vésicules multilamellaires et permettre la formation de vésicules unilamellaires dont la taille est centrée autour de 170 nm de diamètre pour des pores de 200 nm de diamètre, 100 nm de diamètre pour des pores de 100 nm de diamètre, 280 nm de diamètre pour des pores de 400 nm de diamètre. La taille et la monodispersité des préparations de vésicules lipidiques sont vérifiées par diffusion dynamique de la lumière. La courbure des LUVs est plus proche de la réalité physiologique que ne l'est celle des SUVs. Les LUVs sont cependant des objets beaucoup plus diffusants ce qui peut poser des problèmes lors de l'utilisation des techniques de spectroscopies (dichroïsme circulaire, fluorescence). En effet, la diffusion due à ces objets peut dans certaines conditions être plus forte que le signal obtenu pour la protéine étudiée.

Des vésicules de très grande taille (GUV pour Giant Unilamellar Vesicle) sont utilisées pour étudier des mécanismes membranaires à l'échelle de la cellule. Leur taille varie de 10 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Le choix du système modèle et principalement celui de la taille des vésicules lipidiques joue un rôle prépondérant dans l'étude des interactions protéine-membrane. Ainsi, le rayon de courbure peut-il influencer sur ces interactions. (cf. Chap.II de l'introduction §VI)



**Figure 30 :** *Comparaison à l'échelle des différents types de vésicules lipidiques. A* représentation schématique d'une double bicouche. **B :** Schéma d'une MLV. **C :** schéma d'une SUV. **D :** Schéma d'une LUV.





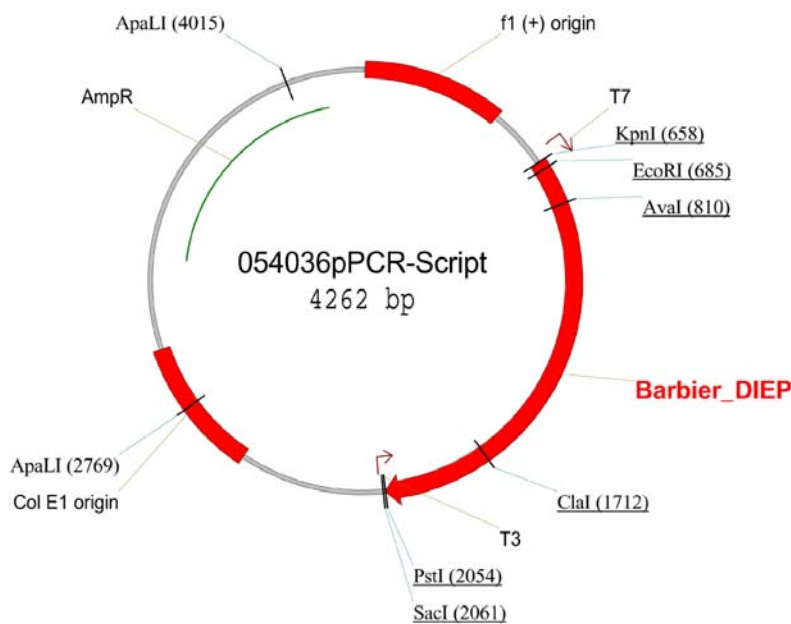
# *MATERIEL ET METHODES*



**A – PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES**

**I – Clonage du domaine de translocation**

Le clonage a été réalisé à partir d'un gène de synthèse commandé à la société GENEART (Regensburg, Allemagne) codant pour les résidus N418 à S877 de BoNT/A, qui correspond à la protéine recombinante T1 (Fig. 13 § A.VI.4). Le gène de synthèse a été cloné dans un vecteur pCR Script (Fig. 31).



**Figure 31 :** Schéma du plasmide PCR-Script dans lequel a été cloné le gène de synthèse codant pour T1 (Barbier\_DIEP). Le plasmide comporte un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR).

Le recours à un gène de synthèse s'est avéré nécessaire car des expériences préliminaires ont montré que le domaine T s'exprime très peu chez *Escherichia coli* à partir de la séquence naturelle provenant de *Clostridium botulinum*. D'autre part, l'index d'adaptation des codons de BoNT chez *E. coli* est très faible. Un site de restriction *Sph* I a été ajouté à l'extrémité 5' de la séquence codant pour T1 et un site de restriction *Pst* I a été ajouté à l'extrémité 3'.

Le gène de synthèse a également été muté sur une séquence analogue à la séquence de Shine Dalgarno afin d'éviter un éventuel départ de traduction au milieu de la séquence codante. Enfin, la cystéine 791 a été substituée par une sérine afin de prévenir la formation de ponts disulfures illégitimes. La séquence naturelle ainsi que la séquence optimisée sont représentées en Annexe 1.

## **II – Clonage de Tm et Ts (C454-S877 et K547-S877 respectivement dans la BoNT/A entière)**

Les clonages ont été effectués à partir du vecteur pCR-Script contenant le gène de synthèse codant pour Tl. Les domaines Tm et Ts ont été amplifiés par PCR. Les séquences d'amorce utilisées sont :

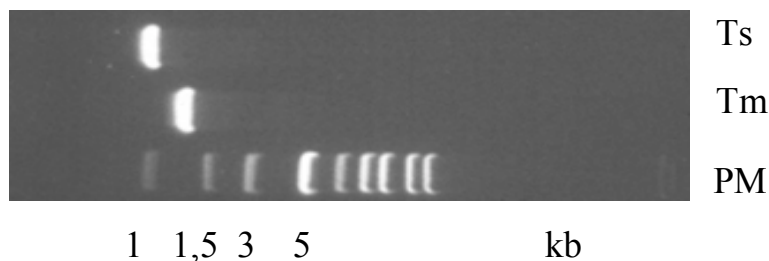
- en 5' TmBontsynt53 (GGATCCGCATGCCTCTATCAAAGTGAACAACACTGGG) et TsBontsynt53 (GGATCCGCATGCCAAATACACCATGTTCCACTATCTGCG) pour Tm et Ts respectivement
- TBontAsynt35 (GCTTGGCTGCAGTTAGCTGTGTTGATGATGTTTTTGGATG) en 3'.

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 100  $\mu\text{L}$  en présence de 800  $\mu\text{M}$  de dNTP (Sigma), 50  $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de chaque oligonucléotide TBontsynt53 et TBontAsynt35, 10  $\mu\text{L}$  de tampon 10X Taq High Fidelity de Roche contenant 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50 ng d'ADN PCR Script, 3,5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de Taq Expand high Fidelity PCR System (Roche) et d'eau milliQ qsp 100  $\mu\text{L}$ . Le programme d'amplification du thermocycleur est composé des étapes suivantes :

- Un cycle de 2min à 94°C
- 10 cycles composés de la séquence :
  - 94°C, 30 s
  - 55°C, 30 s
  - 72°C, 30 s
- 20 cycles de la séquence :
  - 94°C, 30 s
  - 55°C, 30 s
  - 72°C, 45 s+ 5 s
- un cycle à 72°C pendant 4 min



Les résultats obtenus par l'amplification par PCR des domaines Tm et Ts à partir du vecteur pCR Script sont présentés dans la Figure 32. Les domaines Tm et Ts présentent respectivement une bande caractéristique à 1288 pb et 1009 pb.



**Figure 32 :** *Electrophorèse sur gel d'agarose après amplification par PCR des domaines Tm (1288 pb) et Ts (1009 pb) à partir du vecteur pCR Script.*

Les produits de PCR ont ensuite été purifiés en utilisant le « QIAquick PCR Purification kit » (Qiagen). Après purification, les produits de PCR ont été digérés par les enzymes de restriction *Sph* I puis *Pst* I. Ces deux enzymes sont présentes dans le site multiple de clonage du vecteur pQE-81L (Qiagen) qui sera utilisé pour l'expression dans *E. coli*. La ligation entre l'insert Tm doublement digéré (300 à 500 ng) et le vecteur d'expression pQE-81L linéarisé (100 ng) a été réalisée en présence de T4 DNA ligase (2  $\mu$ L à 400 000 U.mL<sup>-1</sup>) (Promega) en présence de 2  $\mu$ L de tampon 10X T4 DNA Ligase (300 mM Tris-HCl pH 7,8, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM dithiothréitol, 10 mM ATP), 25  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de BSA, dans un volume final de 20  $\mu$ L, pendant 2 h minimum à température ambiante. Le vecteur d'expression pQE-81L présente une séquence poly-histidine en amont du site de clonage, permettant ainsi d'obtenir une protéine recombinante présentant une étiquette poly-histidine en N-terminal. Cette étiquette « Histidine » permettra la purification ultérieure des protéines recombinantes et leur détection sur Western Blot grâce à des anti-corps anti-poly-histidine.

Des bactéries compétentes XL<sub>1</sub>Blue ont ensuite été transformées par électroporation (Biorad) avec le produit de ligation, puis étalées sur boîte de Petri contenant du milieu LB Agar additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) et incubées à 37°C sur la nuit. La présence de l'insert dans différents clones obtenus a alors été vérifiée par digestion de l'ADN plasmidique par les enzymes de restriction *Sph* I et *Pst* I, suivie d'une migration des produits de digestion sur gel d'agarose 1 % afin d'observer la taille des fragments. Enfin, l'ADN des clones présentant l'insert a été amplifié et séquencé afin de valider la séquence et de vérifier le respect du cadre de lecture.

### **III - Séquençage**

La vérification de la séquence codante des différents plasmides obtenus après clonage a été effectuée par analyse de l'ADN plasmidique par séquençage. Deux colonies présentant l'insert ont été sélectionnées et des cultures de 200 mL en milieu LB additionné d'ampicilline ont été réalisées afin d'obtenir leur ADN plasmidique à l'aide du kit Midiprep (Sigma). Le séquençage est ensuite réalisé à l'aide du kit Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction (Applied Biosystems #4336776) sur l'automate ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Brièvement, le mélange utilisé lors de la réaction de PCR de séquençage est composé : de 100 à 500 ng d'ADN plasmidique, des amorces dont la concentration finale est de  $3,2 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , de 1  $\mu\text{L}$  du mélange « Big Dye Terminator », 3  $\mu\text{L}$  de tampon 5X (400 mM Tris-HCl pH 9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>), dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$ . La réaction de PCR consiste en 30 cycles suivant la séquence : 96°C pendant 10s, 50°C pendant 5s, 60°C pendant 4 min. Les produits de PCR sont ensuite précipités par incubation en présence de 80  $\mu\text{L}$  d'éthanol froid à 76 % pendant 15 min à -20°C. Après centrifugation des échantillons 15 min à 14000 rpm et 4°C, le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est séché à température ambiante pendant environ 15 min. Le culot est ensuite repris dans 20  $\mu\text{L}$  de « Hi-Di Formamide » (Applied Biosystems #4311320). Après mélange, les échantillons sont placés 2 min à 100°C puis 2 min dans la glace pour dénaturer l'ADN. Les mélanges sont enfin transférés dans un tube spécifique pour le séquenceur.

**B – EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA PROTEINE**

Les précultures de bactéries transformées par les plasmides codant pour les différentes protéines étudiées ont été réalisées dans 200 mL de milieu LB additionné d'ampicilline ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) sur la nuit à  $37^\circ\text{C}$ . Pour chaque préculture, 15 mL ont été prélevés le lendemain afin d'inoculer 1 L de milieu Terrific Broth (TB) additionné d'ampicilline ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Chaque culture a ensuite été incubée sous agitation à  $37^\circ\text{C}$  jusqu'à l'obtention d'une  $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,6-0,7$  correspondant à la phase exponentielle de croissance de la culture bactérienne. L'expression de chaque protéine a alors été induite par ajout d'IPTG 1 mM, suivi d'une incubation 3-4h à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation. Les cultures ont alors été centrifugées 30 min à 14000 rpm à  $4^\circ\text{C}$ . Le surnageant a alors été jeté et le culot bactérien a été conservé afin d'extraire les protéines recombinantes.

**I - Extraction des protéines à partir des culots bactériens**

Le culot bactérien obtenu pour 1 L de culture a été repris dans 40 mL de tampon d'extraction froid ( $20 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $500 \text{ mM NaCl}$ ,  $10 \text{ mM imidazole}$ , à pH 8). La paroi bactérienne a été digérée par ajout de lysozyme ( $1 \text{ mL à } 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) et l'activité des protéases a été inhibée par ajout de PMSF (Phényl-méthyl-sulfonyl-fluoryl) à  $0,1 \text{ M}$  finaux. Les bactéries ont ensuite été lysées par passage dans un broyeur à cellules et le lysat obtenu a été centrifugé 30 min à  $4^\circ\text{C}$  à 1800 rpm. L'analyse de fractions provenant du surnageant et du culot bactérien ainsi obtenu a permis de localiser les protéines recombinantes dans les corps d'inclusion. La purification des protéines recombinantes a donc été réalisée à partir des corps d'inclusion repris en tampon  $8 \text{ M urée}$ ,  $0,1 \text{ M Tris-HCl}$  à pH 8.

## **II - Purification par chromatographie d'affinité et repliement**

Les protéines recombinantes possèdent une étiquette poly-histidine à leur extrémité N-terminale, permettant leur purification sur colonne d'affinité au Nickel. La purification s'effectue en plusieurs étapes.

### **II.1 - Purification sur colonne d'affinité au Nickel**

La colonne utilisée est une Hi-Trap Chelating 5 mL (GE-Healthcare). Le débit de la pompe est de 5 mL.min<sup>-1</sup>. La détection des protéines en sortie de colonne est effectuée grâce à un lecteur de densité optique.

La colonne conservée dans de l'éthanol 20 % à 4°C a été rincée avec 5 volumes d'eau avant d'être chargée en ions Ni<sup>2+</sup> avec 10 mL de NiCl<sub>2</sub> à 0,1 M. La colonne a ensuite été lavée avec 5 volumes d'eau milliQ avant d'être équilibrée avec le tampon Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM (NaP) pH 8, NaCl 500 mM, imidazole 10 mM, 8 M urée. L'échantillon contenant la protéine a alors été chargé sur la colonne. Un passage de tampon NaP 20 mM, NaCl 500 mM, imidazole 10 mM, 8 M urée a été réalisé sur la colonne afin d'éliminer les protéines non adsorbées sur la résine. Le même tampon contenant 50 mM d'imidazole a ensuite été passé afin de décrocher les protéines liées non spécifiquement à la colonne. La protéine recombinante d'intérêt a enfin été éluée par passage de tampon contenant 500 mM imidazole. La fraction recueillie a été conservée à 4°C. Les fractions sont analysées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE suivi d'un Western-Blot. (Annexe 2).

La colonne a ensuite été lavée avec du tampon NaP 20 mM, NaCl 500 mM, EDTA 50 mM et imidazole 10 mM, 8 M urée puis avec de l'eau milliQ et enfin de l'éthanol 20%, puis stockée à 4°C.

## **II.2 - Replieement de la protéine recombinante Tm**

Les protéines sont dans un tampon dénaturant contenant de l'urée 8 M. Le replieement des protéines passe par l'élimination de l'urée. L'élimination progressive de l'urée a été obtenue en réalisant 3 dialyses de 4 h successives de l'échantillon obtenu après purification, contre 2 L de tampon NaP 20 mM à pH 8, à 4°C.

## **III - Purification par chromatographie d'exclusion de taille**

Cette deuxième étape de purification est effectuée sur la solution de protéines repliées, après dialyse. Elle permet d'éliminer certaines protéines contaminantes éluées avec la protéine d'intérêt.

Le débit de la pompe est 1 mL.min<sup>-1</sup>. Après rinçage par passage d'1 L d'eau milliQ, la colonne a été équilibrée la veille de son utilisation avec le tampon NaP 20 mM à pH 8. L'échantillon à purifier a ensuite été chargé sur la colonne puis élué avec un tampon NaP 20 mM à pH 8. Les fractions sont collectées et conservées à 4°C avant analyse par électrophorèse sur gel SDS-PAGE suivi d'un Western-Blot (Annexe 3).

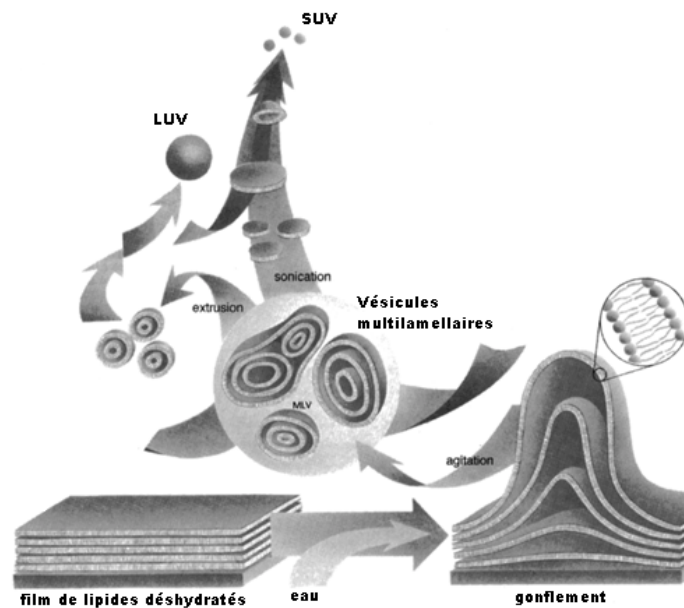
## **IV - Dessalage des protéines et lyophilisation**

Les études menées sur les protéines recombinantes nécessitent de fortes concentrations en protéines et de faibles concentrations en sels. Il est donc nécessaire d'éliminer les sels présents dans l'échantillon. Cette étape de dessalage de la protéine est effectuée par passage de la protéine recombinante sur une colonne G25 SF (GE-Healthcare). Le débit de la pompe est alors de 10 mL.min<sup>-1</sup>. Lors de cette étape, le tampon NaP 20 mM à pH 8 a été remplacé lors de l'équilibration de la colonne et de l'éluion par une solution contenant un sel volatil, le NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> dans l'eau à 1 g.mL<sup>-1</sup>. Les fractions recueillies après dessalage ont été analysées par gel SDS-PAGE suivi d'immuno-détection par Western Blot (Annexe 3). Après dessalage, la protéine a été lyophilisée et conservée à 4°C. Lors de la lyophilisation, le NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> est éliminé : la protéine peut donc être remise en suspension dans le tampon adéquat pour les expériences ultérieures.

C - OBTENTION DES VESICULES LIPIDIQUES

**I - Rappels sur les mécanismes de formations des vésicules lipidiques**

Les différents phénomènes mis en jeu lors de la préparation de vésicules phospholipidiques sont illustrés dans la Figure 33.



*Figure 33 : Phénomènes mis en jeu lors de la formation de MLVs (multilamellar vesicles), de SUVs (small unilamellar vesicles) et de LUVs (large unilamellar vesicles) à partir de films lipidiques secs.*

Des vésicules lipidiques sont formées lorsque des films lipidiques sont hydratés : les feuillettes de bicouches lipidiques deviennent fluides et gonflent. Ainsi hydratés, les feuillettes se détachent pendant l'agitation et s'individualisent pour former de grandes vésicules multilamellaires (MLVs pour multilamellar vesicles). L'apparition de bicouches lipidiques empêche l'interaction directe de l'eau avec les chaînes aliphatiques des lipides. La réduction de la taille des MLVs, ainsi que l'acquisition d'un caractère unilamellaire, exigent l'absorption d'énergie sous forme, par exemple, d'ultrasons (sonication) ou d'énergie mécanique (extrusion).

## **II - Préparation des vésicules lipidiques**

Les lipides utilisés sont :

- Egg Phosphatidyl Choline (EPC ref.: 840051C), Avanti Polar Lipids Inc. Alabaster AL.
- Egg Phosphatidic Acid (EPA ref.: 840101C), Avanti Polar Lipids Inc. Alabaster AL.
- (16:0-18:0(9-10BR)-PC: 1-Palmitoyl-2-Stearoyl(9-10)dibromo-sn-Glycero-3-Phosphocholine; ((9-10BR)-PC ref.: 850481C), Avanti Polar Lipids Inc. Alabaster AL.
- N-(5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Dansyl-DHPE ref :D57), Molecular Probes, Invitrogen.
- NBD-phosphatidyl ethanolamine (NBD-PE ref: N-360), Molecular Probes, Invitrogen.

Les lipides sont sous forme de solution chloroformique. Ces solutions sont stockées à -20°C sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) afin d'éviter l'oxydation.

### **II.1 - Obtention de petites vésicules unilamellaires (SUVs)**

Le principe de fabrication des Small Unilamellar Vesicles (SUVs) est simple. Il faut dans un premier temps former de "gros objets" lipidiques composés de multicouches lamellaires (MLVs). Ces objets sont ensuite cassés avec des ultrasons pour former des objets plus petits, les SUVs.

- ***Des lipides aux vésicules multilamellaires (MLVs)***

Cette étape est commune à la préparation des SUVs et des LUVs. La préparation des MLVs requiert tout d'abord l'obtention d'un film lipidique à partir des solutions chloroformiques. Dans un premier temps, la quantité nécessaire de lipides est versée dans un ballon en verre rôdé d'un volume 20 fois supérieur au volume final souhaité. Le chloroforme est évaporé jusqu'à obtention d'un film lipidique sous pression réduite dont le bain marie aura été thermostaté à 35°C.

Le film lipidique est ensuite repris dans moitié volume final d'éther et moitié volume final de tampon aqueux [1](Ci/NaCi, NaP 10 mM pH 7). Ce mélange est soniqué jusqu'à obtention d'une émulsion. Puis l'éther est évaporé à température ambiante, par diminution graduelle de la pression à l'intérieur du ballon en verre rodé en évitant de faire bouillir l'éther. L'évaporation graduelle de l'éther va induire la réorganisation des lipides en bicouches concentriques. Les MLVs sont formés. Le volume de la solution de MLVs (MultiLamellar Vesicle) est ensuite ajusté au volume souhaité par ajout du tampon.

- ***Des vésicules multilamellaires aux SUVs***

Les SUVs sont préparés par sonication. Les MLVs sont ensuite soniquées (Sonicator ultrasonic processor XL, Misonix incorporated) à 20 % de puissance pendant 45 min, dans un bain de glace, avec pour 1 s de « pulse on » 2 s de « pulse off ». A l'issue de la sonication, les SUVs sont centrifugés à 49000 rpm dans un rotor TLA 100.3 en utilisant une ultra-centrifugeuse Optima TLX (Beckman Coulter) pendant 1 h à 4°C pour éliminer dans le culot les débris de sonde ainsi que les MLVs résiduelles. Le surnageant est récupéré. Les SUVs se conservent 48 h à 4°C.

## **II.2 - Obtention de grandes vésicules unilamellaires (LUVs)**

De même que pour les SUVs, le principe de fabrication des Large Unilamellar Vesicles (LUVs) consiste dans un premier temps en la formation de MLVs. Ces objets subissent ensuite plusieurs passages à travers des filtres de porosité connue sous pression d'azote pour former des objets unilamellaires plus petits, les LUVs.

- ***Des lipides aux vésicules multilamellaires***

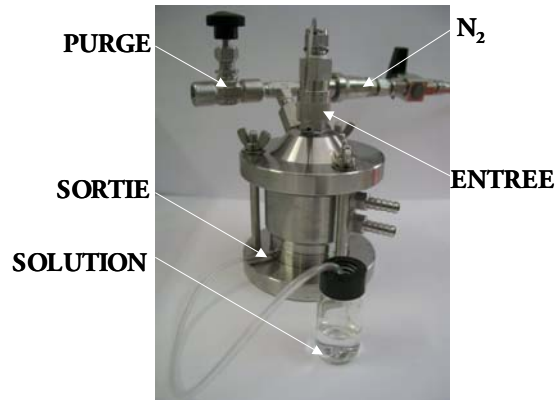
L'étape d'obtention des MLVs est commune à celle décrite précédemment §C.II.1.

- ***Des vésicules multilamellaires aux LUVs***

Les LUVs sont formés à partir de la solution de MLVs par extrusion. L'extrusion est une technique dans laquelle une suspension lipidique est forcée à passer au travers d'un filtre de polycarbonate (comportant des pores de taille définie) pour générer des vésicules unilamellaires ayant un diamètre proche de la taille des pores du filtre utilisé.



L'appareil employé – appelé extruder (LIPEX extruder, Northernlipids) – comporte différentes parties. Le montage expérimental employé lors de nos expériences est illustré par la photographie de la Figure 34.



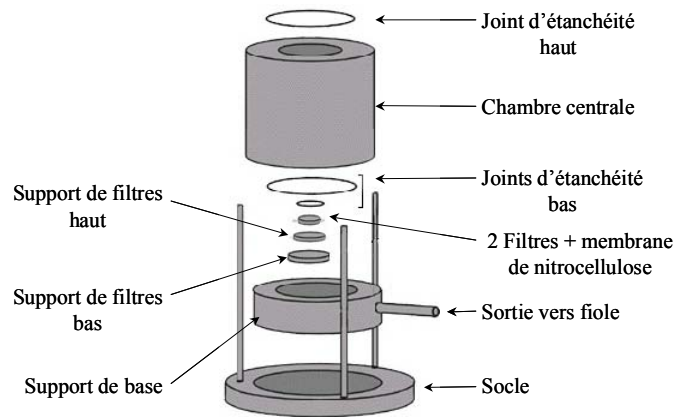
*Figure 34 : Dispositif expérimental d'extrusion utilisé dans ce travail.*

Les parties extérieures de l'appareil sont au nombre de trois : un couvercle, des éléments centraux à assembler et un socle.

Le couvercle comporte les parties suivantes :

- une entrée pour l'azote, délivré à une pression de 12 bars, équipée d'un robinet pour stopper l'alimentation entre chaque passage,
- une valve de purge permettant de vider le gaz contenu dans l'appareil et de revenir à pression atmosphérique,
- une entrée pour charger la suspension à extruder,
- une sortie équipée d'un tuyau pour récupérer l'échantillon filtré dans une fiole.

Les différents éléments à assembler sont nécessaires à la filtration et à l'étanchéité du montage. La liste et l'ordre d'assemblage de ces composants sont illustrés dans la Figure 35.



*Figure 35 : Schéma du montage des différents éléments centraux de l'extruder.*

Sur le socle est placé le support des filtres qui comporte un trou central assurant la sortie pour l'échantillon filtré. L'empilement des différents éléments se fait par ordre décroissant de taille des pores, c'est-à-dire de la manière suivante :

- deux supports métalliques pour filtres,
- une membrane de nitrocellulose qui servira d'amortisseur lors de la mise en pression de l'appareil,
- deux filtres polycarbonate, préalablement humidifiés de manière à éviter la formation de bulles d'air. Deux filtres sont utilisés de manière à assurer une filtration optimale même en cas de rupture de l'un des deux filtres. Selon la taille des vésicules choisies, l'extruder est assemblé à l'aide de filtres dont les pores ont un diamètre de 100 nm (Nuclepore), de 200 nm de diamètre (Millipore, isopore, ref: GTTP02500) ou de 400 nm de diamètre (Millipore, isopore, ref: HTTP02500).
- Deux joints d'étanchéité (un de faible et un de grand diamètre) sont ajoutés de manière à supporter le placement de la chambre centrale. Celle-ci comporte des branchements permettant de réguler sa température (Figure 34). Toutes nos préparations sont effectuées à température ambiante.

Une fois l'extruder monté, la solution de MLVs à filtrer est introduite dans la chambre centrale à l'aide d'une seringue à travers le couvercle. Le débit d'introduction doit être modéré de manière à éviter la formation de mousses qui pourrait perturber l'étape de filtration. Une fois la suspension introduite, un flux d'azote à haute pression dans l'extruder va pousser la solution à travers les filtres. Lorsque la totalité de la solution est filtrée, il faut fermer l'arrivée de N<sub>2</sub> et purger le système en ouvrant le robinet de purge. Le

gaz étant totalement évacué, l'ouverture du bouchon est possible et l'on peut introduire de nouveau la solution à filtrer et entamer un nouveau cycle.

Pour obtenir une suspension homogène de LUVs, 10 cycles de filtration sont effectués sous une pression de 8 bars, lorsque les filtres de 200 nm et 100 nm sont utilisés. La pression est de 3 bars lorsque ce sont des filtres de 400 nm qui sont utilisés.

### **II.3 - Préparation de vésicules lipidiques chargées en sulforhodamine B**

Le protocole de préparation des vésicules lipidiques est le même que décrit ci-dessus (§C.II.2). Cependant le tampon aqueux utilisé pour la préparation est différent, il s'agit d'un tampon Ci/NaCi, NaP 10 mM pH 7 contenant 50 mM de sulforhodamine B (Molecular Probes, Invitrogen, ref: S1307). Une fois les vésicules lipidiques unilamellaires obtenues, la sulforhodamine contenue dans le tampon à l'extérieur des vésicules lipidiques est éliminée par passage de la solution de vésicules sur une colonne PD10 (Sephadex G25M, Amersham Biosciences). La colonne PD10 est préalablement équilibrée avec 25 mL d'un tampon Ci/NaCi, NaP 10 mM, NaCl 50 mM, pH 7. Le NaCl ajouté en concentration équimolaire à celle de la sulforhodamine B permet de conserver un équilibre osmotique lors de l'élution et ainsi, d'éviter l'éclatement des vésicules lipidiques.

Ensuite, 400 µL de vésicules lipidiques à 20 mM sont déposés sur la colonne et le volume est complété à 2,5 mL avec le tampon d'élution pour atteindre le volume minimal à déposer sur ce type de colonne. La colonne permet de séparer les vésicules lipidiques du tampon contenant la sulforhodamine B. Les vésicules lipidiques sont éluées en premier et sont recueillies dans les quatre premiers millilitres d'élution. En sortie de colonne les vésicules lipidiques ont été diluées d'une part 1,4 fois dans la colonne et d'autre part 6,25 fois lors du dépôt. Pour des vésicules lipidiques dont la concentration initiale était 20 mM, la concentration en sortie de colonne est donc de 2,28 mM dans un tampon Ci/NaCi, NaP 10 mM, 50 mM NaCl, pH 7.

### **II.4 - Caractérisation des vésicules par diffusion de lumière**

La taille et l'homogénéité des vésicules lipidiques ont été vérifiées par diffusion dynamique de la lumière (DLS). Pour nos préparations, les mesures ont été réalisées avec un Zetasizer 3000 équipé d'un laser HeNe (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK). La méthode est basée sur la propriété des vésicules à diffuser la lumière dans toutes les

directions, et sur le fait que ces objets sont en mouvement permanent (mouvement brownien). La fréquence et l'amplitude de ces mouvements browniens dépendent de la taille des vésicules et de la viscosité du solvant. La diffusion de la lumière varie avec le temps et peut être reliée au coefficient de diffusion des particules en solution. Cette spectroscopie par corrélation de photon est une technique simple et rapide bien que le traitement mathématique soit complexe.

Les tailles moyennes mesurées pour les différentes tailles théoriques sont :

- Pour les SUVs :  $48,1 \text{ nm} \pm 2,7 \text{ nm}$
- Pour les LUVs 100 nm :  $98,2 \text{ nm} \pm 4,9 \text{ nm}$
- Pour les LUVs 200 nm :  $174,2 \text{ nm} \pm 12,7 \text{ nm}$
- Pour les LUVs 400 nm :  $288,1 \text{ nm} \pm 23,1 \text{ nm}$

Les valeurs 100 nm, 200 nm et 400 nm correspondent au diamètre des pores des filtres utilisés lors de l'extrusion.

Par la suite, les différents types de LUVs seront nommés LUVs 100 nm, LUVs 170 nm et LUVs 280 nm pour des LUVs de taille « théorique » 100 nm, 200 nm et 400 nm respectivement. La taille « théorique » étant définie comme celle des pores des filtres utilisés lors de l'extrusion.

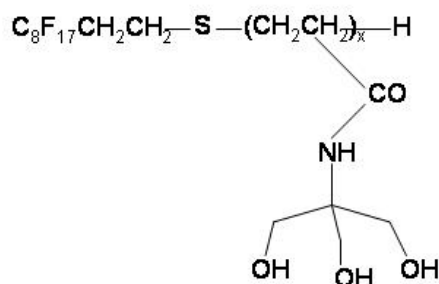
## D – ANALYSES SPECTROSCOPIQUES

### **I - Dichroïsme Circulaire**

- ***Expériences réalisées en présence de Tm***

Les expériences de dichroïsme circulaire sont réalisées sur un spectropolarimètre Jasco J-810, dans des cuves en quartz de trajet optique 1 mm dans l'UV lointain et 10 mm dans l'UV proche. La concentration de Tm est de  $0,5 \mu\text{M}$  pour les spectres effectués dans l'UV lointain et de  $4 \mu\text{M}$  pour les expériences réalisées dans l'UV proche. Pour les expériences de CD, le tampon utilisé est un tampon Ci/NaCi, NaP 5 mM au pH souhaité. Un surfactant fluoré, le C8FTAC (Breyton *et al.*, 2004), est utilisé dans les gammes de pH où la protéine n'est pas soluble. La concentration du C8FTAC (produit fourni par le Laboratoire de Chimie Bio-organique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels de la faculté des sciences d'Avignon) est comprise entre  $0,15 \text{ mM}$  et  $0,3 \text{ mM}$  (soit 5 et 10 fois sa cmc) dans l'UV lointain et l'UV proche respectivement. En présence de vésicules

lipidiques, les ratios molaires Lipides/Protéines (L/P) utilisés sont de 500. La composition des vésicules lipidiques est EPC/EPA 9:1.



**Figure 36 : Formule du C8FTAC.** Ce détergent fluoré a la propriété de respecter l'intégrité des membranes lipidiques.

Pour les expériences réalisées dans l'UV lointain, chaque spectre obtenu est la moyenne de 15 enregistrements à une vitesse de 100 nm.min<sup>-1</sup> avec un pas de 1 nm. La région du spectre utilisée est entre 195 nm et 250 nm.

Pour les spectres effectués dans l'UV proche, chacun est la moyenne de 40 accumulations à une vitesse de 50 nm.min<sup>-1</sup>, avec un pas de 0,5 nm. La région du spectre utilisée va de 250 nm à 320 nm.

Le signal obtenu est l'ellipticité ( $\theta$ ) exprimée en millidegrés (mdeg). Les spectres sont présentés en ellipticité molaire par résidu ( $[\theta]$  en deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>) en fonction de la longueur d'onde, ce qui permet de comparer les différents spectres :  $[\theta] = 0,1.\theta/(C.N.l)$  avec « C » la concentration de protéine en mol.L<sup>-1</sup>, « l » le trajet optique en cm et « N » le nombre de résidus du polypeptide.

- **Expériences réalisées en présence de l'apomyoglobine**

Les spectres sont enregistrés sur un spectropolarimètre Jasco J-810. Chaque spectre enregistré dans l'UV lointain est la moyenne de 30 accumulations entre 190 et 250 nm à une vitesse de 50 nm.min<sup>-1</sup> avec un pas de 1 nm. Le trajet optique de la cuve en quartz est de 1 mm. La concentration en aMb est de 2,5 μM. Lorsque les spectres sont enregistrés en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA), le ratio molaire L/P est de 300.

## **II - Fluorescence**

### **II.1 - Fluorescence du Tryptophane**

- *Expériences réalisées avec Tm*

La fluorescence du tryptophane est sensible à son environnement. Ainsi lorsqu'un Trp est exposé à un environnement polaire, sa longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence ( $\lambda_{\text{max}}$ ) sera située aux alentours de 350 nm; mais lorsque son environnement est apolaire cette valeur est déplacée vers des longueurs d'onde plus courtes et peut atteindre 330 nm.

Les expériences de fluorescence du tryptophane sont réalisées sur un fluorimètre Jasco FP-6500 dans une cuve en quartz de 10 mm de trajet optique. Les spectres sont la moyenne de 3 accumulations. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 292 nm. Les bandes passantes sont de 3 nm en excitation et en émission. La vitesse est 125 nm.min<sup>-1</sup> et le temps de réponse est de 1 s. Lors de ces expériences la concentration finale de Tm est de 0,5  $\mu\text{M}$  dans un tampon Ci/NaCi, NaP 10 mM au pH souhaité en présence de C8FTAC 0,15 mM de LUVs 170 nm EPC/EPA (9 :1) à un ratio molaire L/P 500.

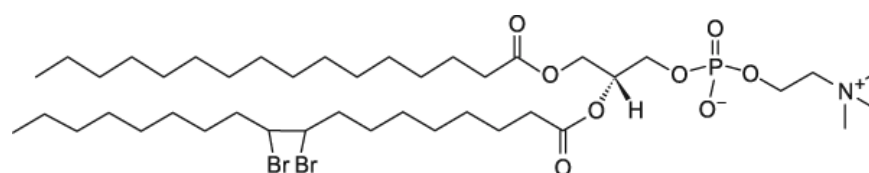
- *Expériences réalisées avec l'apomyoglobine*

Dans le cas de l'apomyoglobine, les expériences de fluorescence du Trp sont effectuées sur un fluorimètre Jasco FP-6500 dans une cuve de 10 mm de trajet optique. Les bandes passantes en excitation et en émission sont de 3 nm. La longueur d'onde d'excitation est de 280 nm. Les spectres sont la moyenne de 3 accumulations. Le pas de temps utilisé est de 1 nm et la vitesse de 125 nm.min<sup>-1</sup>. La concentration de l'apomyoglobine est de 1  $\mu\text{M}$  et le ratio molaire Lipide/Protéine égal à 300. Le tampon utilisé est un tampon Ci/NaCi 4 mM, 50 mM NaCl ou 150 mM NaCl.

## II.2 - Quenching de fluorescence par les lipides bromés

Le brome est un « quencher » de la fluorescence du tryptophane. Il agit à courte distance, soit  $\sim 1$  nm. Lorsque un tryptophane est situé à proximité d'un atome de brome, l'intensité de fluorescence va donc diminuer.

Lors des expériences d'extinction de fluorescence du tryptophane par le brome, des lipides bromés sont introduits dans les vésicules lipidiques anioniques. Les bromes sont situés aux positions 9 et 10 sur les chaînes aliphatiques.



**Figure 37 :** Représentation d'un lipide bromé sur les Carbone 9 et 10 de la chaîne aliphatique. 1-Palmitoyl-2-Stearoyl(9-10)dibromo-sn-Glycero-3-Phosphocholine (9-10BR)-PC

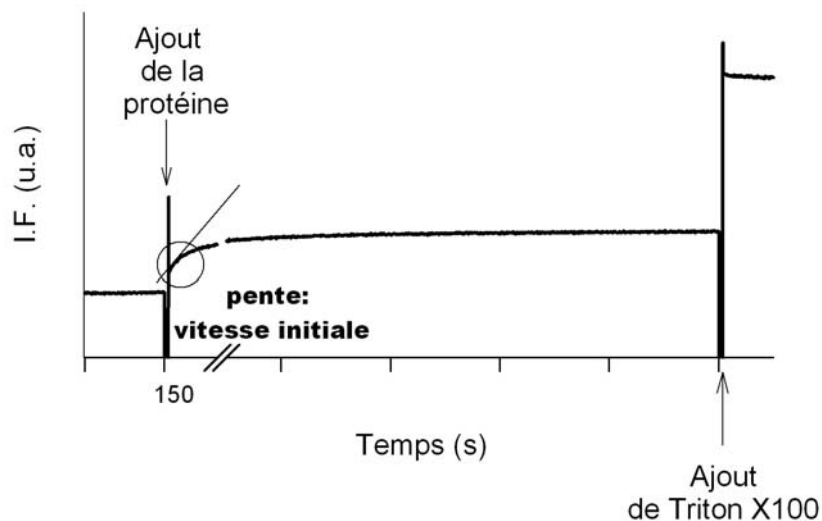
Les vésicules lipidiques sont composées de EPC/EPA/(9-10BR)-PC aux ratios molaires suivants : 7 :1 :2 et 5 :1 :4. Elles sont préparées à une concentration finale de 20 mM en lipides totaux. Les spectres de fluorescence sont réalisés sur un fluorimètre Photon International Technology QM-4/2005 SE à température ambiante dans une cuve en quartz de 10 mm de trajet optique d'un volume de 50  $\mu$ L. Les spectres sont réalisés entre 320 et 360 nm. La longueur d'onde d'excitation est de 292 nm et une bande passante de 3 nm en excitation et de 5nm en émission sont utilisées, le temps de réponse est 1 s. Chaque spectre est la moyenne de 8 accumulations. Les intensités de fluorescence à 350 nm obtenus sont rapportés à l'intensité de fluorescence obtenue dans les mêmes conditions en présence de vésicules lipidiques EPC/EPA. Les expériences sont réalisées à un ratio molaire L/P 500 et à une concentration finale en protéine de 1  $\mu$ M, dans un volume final de 100  $\mu$ L. Les lipides sont pré-incubés dans le tampon Ci/NaCi, NaP 10 mM au pH souhaité pendant 30 min à température ambiante. La protéine est ensuite ajoutée et le mélange est incubé 2 h à température ambiante avant la mesure. Afin de déterminer l'implication de liaisons de type électrostatique en la protéine et la bicouche lipidique, du NaCl, à une concentration finale de 200 mM est ensuite ajouté. Le mélange est incubé sur la nuit à température ambiante. L'augmentation de l'intensité de fluorescence mesurée dans les mêmes conditions que précédemment indique dans ce cas une inhibition de l'interaction protéine-membrane en présence de sels. Cela indique l'implication

d'interaction de type électrostatique dans la liaison entre la protéine et la bicouche lipidique.

### **II.3 - Expériences de perméabilisation de vésicules lipidiques**

- *Expériences réalisées avec Tm*

Le but de ces expériences est d'étudier la déstabilisation des bicouches de vésicules lipidiques due à la liaison et/ou l'insertion de la protéine dans la bicouche. La perméabilisation des vésicules lipidiques peut être due à une déstabilisation de la bicouche, à la formation de canaux au travers de la bicouche par exemple. Le suivi de la perméabilisation se fait grâce à un fluorochrome : la sulforhodamine B que l'on encapsule dans les vésicules lipidiques à une concentration telle (50 mM) qu'il y a auto-extinction de sa fluorescence. Lorsque la bicouche lipidique est perméabilisée, la sulforhodamine B est libérée dans le tampon aqueux. Elle est alors diluée et fluoresce à nouveau. L'évolution de l'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B est suivie en fonction du temps (Fig.38). Elle permet d'accéder à la vitesse initiale de perméabilisation ( $V_0$ ) ainsi qu'au taux de perméabilisation des vésicules lipidiques par la protéine.



*Figure 38 : Exemple de signal obtenu lors des expériences perméabilisation de vésicules lipidiques chargées en sulforhodamine B.*

On peut calculer à partir du signal obtenu la vitesse initiale de perméabilisation des vésicules lipidiques après ajout de protéine, ainsi que le taux de perméabilisation des vésicules lipidiques.

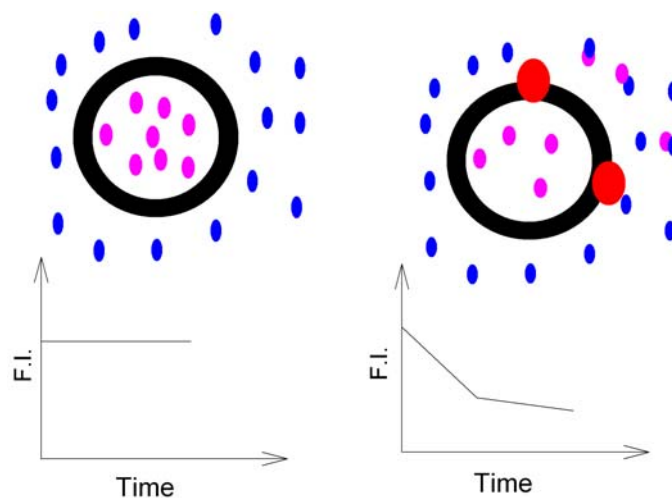


Les expériences sont réalisées sur un fluorimètre Jasco FP-6500 dans une cuve en quartz de 10mm de trajet optique et sous agitation. La longueur d'onde d'excitation est de 565 nm et la longueur d'onde d'émission 586 nm. Les bandes passantes en excitation sont de 3 nm et sont de 5 nm en émission. Le temps de réponse est de 1 s par nm. Les cinétiques se font à température ambiante. Au bout de 150 s, la protéine est ajoutée dans la cuve. En fin de cinétique 60  $\mu$ L de Triton X100 à 10% sont ajoutés pour lyser les vésicules lipidiques.

Les vésicules lipidiques utilisées sont de tailles différentes : SUV, et LUV de 100 nm, 170 nm et 280 nm de diamètre. Elles sont composées de EPC/EPA 9:1 et le ratio molaire L/P utilisé est de 5000 pour Tm et DT (pour la préparation des vésicules lipidiques chargées en sulforhodamine B voir le paragraphe préparation des vésicules lipidiques). La concentration finale est de 20  $\mu$ M de lipides dans un tampon Ci/NaCi, NaP 10 mM, 50 mM NaCl au pH souhaité.

- *Expériences réalisées avec l'apomyoglobine*

Ces expériences sont basées sur le même principe que celles réalisées en présence de Tm. Dans ce cas, un fluorophore, la pyranine (ref : H348, Molecular Probes) est encapsulé dans les vésicules lipidiques. Un « quencher » de la fluorescence de la pyranine, le DPX (p-xylen-bis-myridinium bromide, ref : X1525, Molecular Probes) est ajouté au tampon. Ainsi lors de la perméabilisation des vésicules lipidiques par l'aMb, l'intensité de fluorescence de la pyranine va diminuer. Le principe de l'expérience est schématisé dans la Figure 39.

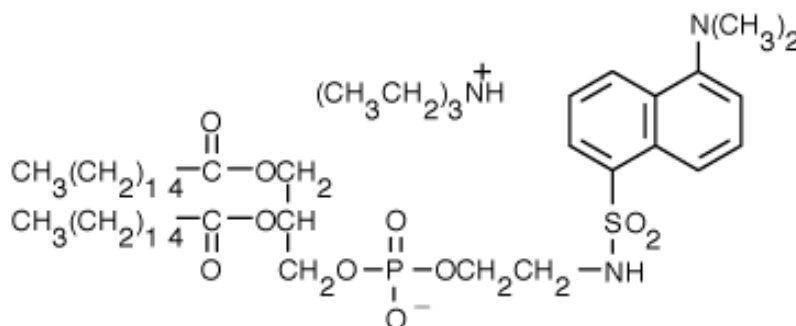


*Figure 39 : Principe de l'expérience de perméabilisation de vésicules lipidiques utilisée dans le cas de l'aMb. La pyranine est représentée en rose, le DPX en bleu et l'aMb en rouge.*

La préparation des LUVs chargées en pyranine est effectuée selon le même protocole que celui de la préparation des LUVs chargées en sulforhodamine B (§C.II.3). La concentration en pyranine à l'intérieur des vésicules lipidiques est de 0,2 mM. La concentration finale en DPX est de 20 mM. Les expériences sont effectuées dans un tampon Ci/NaCi 4 mM, 50 mM NaCl ou 150 mM NaCl. La concentration finale en aMb est de 1 µM. Le ratio molaire L/P est de 350 pour l'aMb en présence de LUVs EPC/EPA (9 :1) et 400 lorsque des LUVs EPC sont utilisées. Les expériences sont effectuées sur un fluorimètre Jasco FP-6500 dans des cuves en quartz de 10 mm de trajet optique et sous agitation. La longueur d'onde d'excitation est de 405 nm et la longueur d'onde d'émission 511 nm. Les bandes passantes sont de 1 nm et de 3 nm en excitation et en émission respectivement. Le temps de réponse est de 1 s.

#### **II.4 - Expériences de FRET Tryptophane/Dansyl-DHPE**

Ces expériences visent à observer la proximité entre une protéine et la bicouche lipidique. Les vésicules lipidiques utilisées sont de tailles différentes. Leur composition est EPC/EPA/Dansyl-DHPE (9:1:0,5) ou EPC/ Dansyl-DHPE (10 :0,5).



**Figure 40 :** Formule semi développée du **Dansyl-DHPE** (*N*-(5-diméthylmaminonaphtalene-1-sulfonyl)-1-2dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine triéthylammonium salt) (D57, Molecular Probes)

Le spectre d'émission de fluorescence du donneur (tryptophanes) recouvre le spectre d'excitation de l'accepteur. Ainsi, le donneur peut transmettre par résonance une partie de son énergie d'excitation à l'accepteur. Cela aura pour conséquence la fluorescence de ce dernier. Plus le transfert d'énergie entre donneur et accepteur sera efficace plus l'accepteur émettra de photons de fluorescence. Cependant, il est important de noter que l'efficacité du transfert de fluorescence est proportionnelle à  $1/R^6$ , avec R la distance Donneur-Accepteur.

La Figure 41 montre un exemple de signaux de fluorescence obtenus à pH 7 et pH 3,8. L'intensité de fluorescence est mesurée en fonction du temps à une longueur d'onde fixe qui correspond à la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence de l'accepteur (520 nm dans ce cas). La longueur d'onde d'excitation utilisée est celle qui convient pour le donneur, dans le cas présent le tryptophane (292 nm dans notre protocole expérimental).

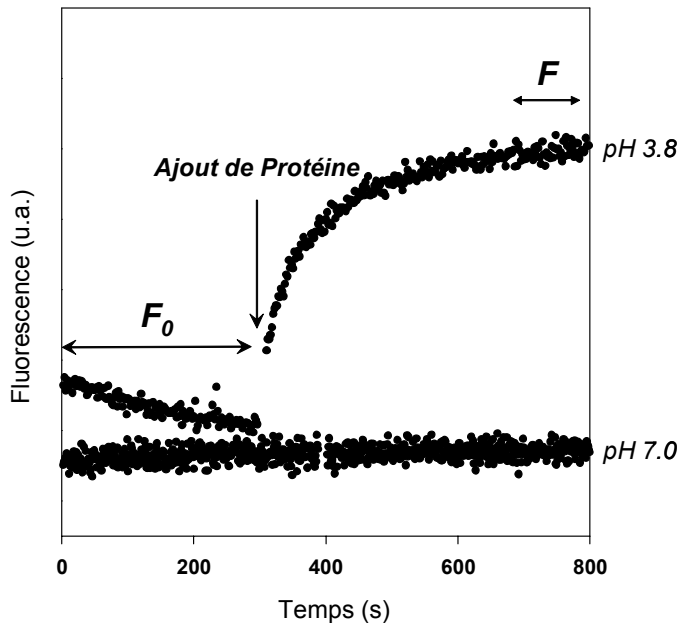


Figure 41 : Exemple de signal de fluorescence obtenu lors des expériences de FRET. L'intensité de fluorescence de l'accepteur (Dansyl-DHPE) est mesurée en fonction du temps avant ( $F_0$ ) et après ajout de la protéine. La fluorescence  $F$  au plateau est utilisée pour quantifier le FRET.

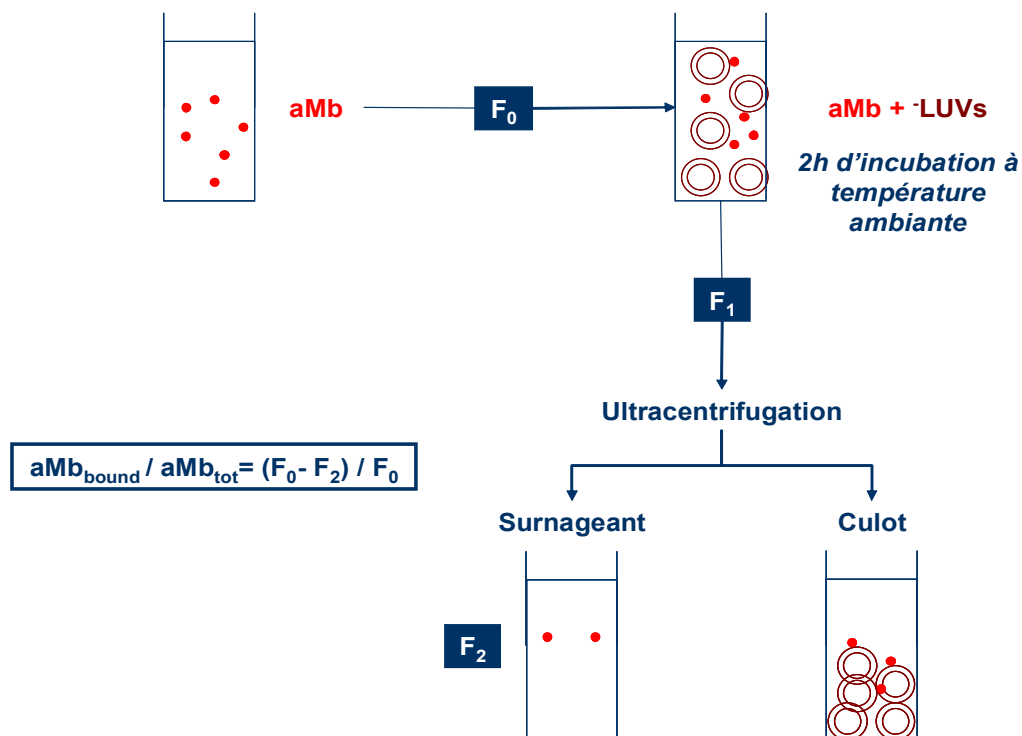
Dans un premier temps, l'intensité de fluorescence des vésicules lipidiques est mesurée, elle est appelée  $F_0$ . La protéine est ensuite ajoutée et l'intensité de fluorescence mesurée jusqu'à ce qu'elle atteigne un plateau indiquant que le transfert de fluorescence est maximal dans les conditions testées. L'intensité de fluorescence au plateau ( $F$ ) est utilisée pour quantifier le transfert d'énergie. L'utilisation du ratio  $F/F_0$  permet la comparaison des résultats de FRET obtenus dans les différentes conditions expérimentales. Lorsque la valeur de  $F/F_0$  est égale à 1, il n'y a pas de transfert entre donneur et accepteur. Plus la valeur de ce ratio est élevée et plus le FRET est efficace.

Les expériences sont réalisées dans un volume final de 2 mL, la concentration finale en protéine est de 0,1  $\mu\text{M}$  et la concentration finale en vésicules lipidiques de 10  $\mu\text{M}$  (ratio molaire L/P 100). Les vésicules lipidiques sont incubées à température ambiante 30 min dans le tampon Ci/NaCi, NaP 10 mM au pH souhaité. Les mesures de fluorescence sont effectuées sur un fluorimètre Photon Technology International QM-4/2005 SE dans une cuve en quartz de trajet optique 1 cm. La longueur d'excitation est de 292 nm et la longueur d'onde d'émission 520 nm. Les bandes passantes en excitation et en émission

sont de 3 nm. Le ratio  $F/F_0$  représente donc le rapport entre les intensités de fluorescence du Dansyl-DHPE au plateau de fluorescence après ajout de protéine (F) et avant ajout de protéine ( $F_0$ ).

### II.5 -Expériences de partition suivies par centrifugation

Le principe de ces expériences est décrit dans la Figure 42. L'intensité de fluorescence de l'aMb seule en solution ( $F_0$ ) à 330 nm est mesurée. L'aMb (1  $\mu$ M final) dans un tampon Ci/NaCi 4 mM, 50 mM NaCl ou 150 mM NaCl, est ensuite laissée à incubée 2 à température ambiante avec des LUVs anioniques (EPC/EPA/NBD-PE 9 :1 :0,05) à un ratio molaire L/P 300. L'intensité de fluorescence de l'aMb ( $F_1$ ) à 330 nm est mesurée pour contrôler que la protéine n'a pas précipitée. Puis le mélange est centrifugé à 265 000 g dans une centrifugeuse Beckman L-70 avec un rotor Ti 70.1 pendant 1h30 à 4°C. Suite à cette étape de centrifugation, les LUVs sont retrouvés dans le culot amenant avec eux la protéine liée. Seule la protéine non liée reste dans le surnageant.



*Figure 42 : Protocole de l'expérience de partition suivie par centrifugation.*

L'efficacité de culottage des LUVs est mesurée grâce à la mesure de la fluorescence du NBD-PE (longueur d'onde d'excitation 464 nm ; spectre d'émission enregistré entre 500 et 600 nm).

La quantité de protéine liée ( $aMb_{\text{bound}}/aMb_{\text{tot}}$ ) est égale à la différence entre l'intensité de fluorescence à 330nm de l'aMb avant centrifugation ( $F_0$ ) corrigée par le facteur de dilution amenée par l'ajout des LUVs, et celle du surnageant après centrifugation ( $F_2$ ).

## **II.6 -Expériences de diffusion de la lumière**

Ces expériences sont réalisées pour l'apomyoglobine (1  $\mu\text{M}$ ) en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA, 9 :1) à un ratio molaire L/P 350 et pour le domaine de translocation de la toxine diphtérique (100 nM) à un ratio molaire L/P 3000. Les tampons utilisés sont pour l'aMb un tampon Ci/NaCi 4mM, 30mM NaCl ou 150 mM NaCl et pour le domaine de translocation de la toxine diphtérique un tampon Ci/NaCi 5 mM. Les expériences sont réalisées sur un spectrofluorimètre Jasco FP-6500. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont toutes les deux fixées à 600 nm.

|   |
|---|
| <b>E – EXPERIENCES DE PONTAGE AU GLUTARALDEHYDE</b> |
|---|

Les expériences de pontages au glutaraldéhyde sont réalisées à pH 7 et pH 4. Dans un premier temps la protéine est solubilisée dans un tampon Ci/NaCi, NaP 5 mM, 0,3 mM C8FTAC à pH 7 soit dans une solution de LUVs anioniques (EPC/EPA 9 :1) préparée dans un tampon Ci/NaCi, NaP 5 mM à pH 7 à un ratio molaire final L/P 1000. La protéine solubilisée en présence de LUVs ou de C8FTAC est ensuite « diluée » dans un tampon Ci/NaCi, NaP 5 mM à pH 7 ou pH 4 de façon à obtenir une concentration finale de 0,5  $\mu\text{M}$  de protéine dans un volume de 140  $\mu\text{L}$ . La réaction de pontage est initiée par ajout de glutaraldéhyde au pourcentage massique souhaité. Le pourcentage massique final de glutaraldéhyde utilisé est de 0,01% pour les cinétiques effectuées à pH 7 et de 0,025% à pH 4. Le temps « 0 » correspond à un aliquot prélevé (20  $\mu\text{L}$ ) juste après ajout de glutaraldéhyde dans le milieu. L'arrêt de la réaction de pontage se fait par ajout d'Arginine à 200 mM final et incubation 30 min à température ambiante. Les aliquots sont ensuite déposés sur un gel SDS-PAGE 8%. La détection de la protéine est réalisée par immunodétection utilisant un anticorps anti-histidine.

F – EXPERIENCES D'ÉCHANGE HYDROGENE/DEUTERIUM

**I - Principe général de l'expérience**

L'expérience est effectuée à faible force ionique à pH 4 et pH 5,5 pour la protéine en solution et en présence de LUVs anioniques. Nous avons choisi d'effectuer des échanges Deuterium/Hydrogène (D/H) pour des raisons pratiques. En effet, le dépôt des échantillons sur la plaque de mesure du spectromètre de masse nécessite l'utilisation de solutions hydrogénées. Les hydrogènes présents entraîneraient des reéchanges D/H. La protéine a donc été préalablement deutérée. Les LUVs ont également été préparées dans des tampons deutérés. Le protocole de l'expérience est schématisé dans la Figure 43.

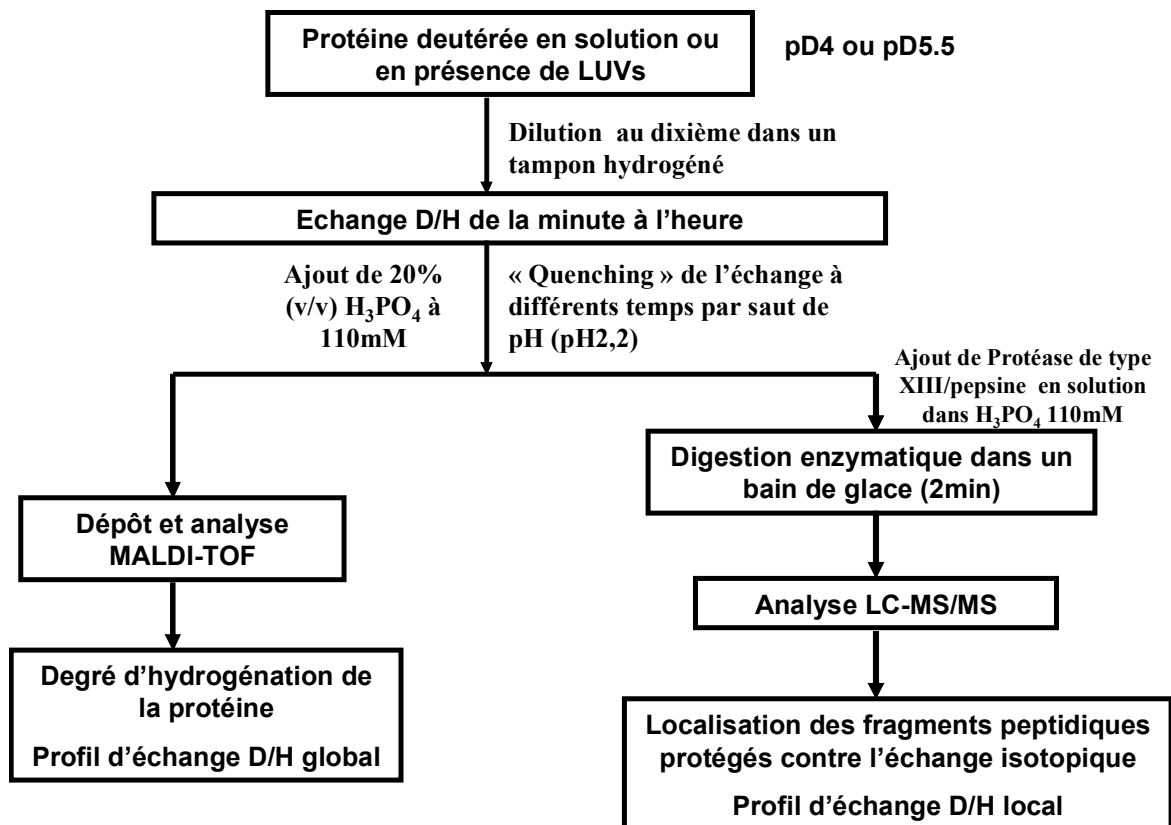


Figure 43 : Protocole de l'expérience d'échange D/H en solution ou en présence de lipides.

Les expériences ont été réalisées en chambre froide (4°C) de façon à ralentir les vitesses d'échanges isotopiques. La réaction d'échange D/H est précédée par une étape d'incubation : la protéine deutérée lyophilisée et dissoute dans un tampon deutéré avec ou sans LUVs anioniques, puis incubée 2 heures à température ambiante. Ces deux conditions sont testées pour chaque valeur de pD (pD 4 et pD 5,5). Le pD des différentes solutions est

mesuré sur un pH-mètre standardisé avec des solutions hydrogénées. La correspondance est donnée par l'équation  $pD = pH_{\text{mesuré}} + 0,4$  (Glasoe & Long, 1960). La réaction d'échange D/H est amorcée par dilution du mélange deutéré dans un tampon citrate hydrogéné à pH 4 ou pH 5,5. L'échange isotopique est stoppé (étape dite de « quenching ») par saut de pH jusqu'à pH 2,2 à différents temps. A cette valeur de pH, les échanges sont très ralentis (Bai *et al.*, 1993). Les échantillons sont congelés rapidement dans l'azote liquide après « quenching » de la réaction et conservés à -20°C avant analyse.

Les cinétiques globales sont analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight). Bien que peu couramment utilisée dans ce type d'expériences, l'analyse de type MALDI est ici justifiée car elle est compatible avec la présence de lipides dans l'échantillon.

Les cinétiques globales nous donnent des informations sur la protection de la protéine entière lors de son interaction avec les membranes, mais n'apportent aucune indication quant à la localisation des régions impliquées dans cette interaction, c'est pourquoi des cinétiques dites locales sont réalisées. Ces dernières sont accompagnées d'une digestion enzymatique. L'analyse par spectrométrie de masse des fragments peptidiques obtenus permettra de déterminer leur implication dans l'interaction de la protéine avec la membrane grâce à leur profil de protection contre les échanges isotopiques.

Pour les cinétiques locales, les échantillons sont rapidement décongelés puis les digestions peptidiques (pepsine/protéase de type XIII) sont effectuées dans un bain de glace de façon à limiter les rééchanges à pH 2,2. L'analyse des fragments peptidiques est effectuée par LC-MS/MS en utilisant une source d'ionisation de type electrospray (ESI). Le séquençage des peptides issus de ces digestions a été réalisé au préalable de façon à pouvoir identifier chaque peptide.

## **II - Deutération de l'apomyoglobine**

L'apomyoglobine utilisée dans ces expériences a été produite précédemment au laboratoire. Le protocole suivi est ce lui décrit dans l'article de Weisbuch *et al.*, 2005. L'apomyoglobine hydrogénée lyophilisée est dissoute dans du D<sub>2</sub>O pur à pD 7 à une concentration finale de 50 µM. Après une incubation sur la nuit à température ambiante, la

solution est lyophilisée puis la protéine est à nouveau dissoute dans du D<sub>2</sub>O pur à pD 7. Trois cycles successifs sont réalisés.

### **III - Incubation**

L'incubation de la protéine seule et en présence de LUVs anioniques est réalisée à température ambiante à pD 4 et pD 5,5. Les pH effectivement mesurés sur le pH-mètre sont pH 3,6 et pH 5,1 respectivement de façon à correspondre aux pDs souhaités. La protéine deutérée et lyophilisée est resuspendue dans un tampon Citrate 4 mM, 30 mM NaCl deutéré en absence et en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA (9 :1)) à un ratio molaire L/P 300. La concentration finale de la protéine est de 26 µM et celle des lipides 7,8 mM. Dans ces conditions, la totalité de la protéine est liée aux membranes (Vernier *et al.*, 2007). L'incubation dure 2 h à température ambiante.

### **IV - Cinétiques d'échange D/H**

Les cinétiques sont réalisées en chambre froide. Elles sont initiées lors de la dilution au dixième dans un tampon citrate 4 mM, NaCl 30 mM pH 4 ou pH 5,5 hydrogéné. A chaque temps, allant de la minute à plusieurs heures, 80µL sont prélevés et mélangés rapidement à 20 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 110 mM et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C avant analyse.

### **V - Digestion enzymatique**

Les digestions enzymatiques consécutives aux échanges D/H sont effectuées dans un bain de glace à 0°C. Les protéases utilisées sont la pepsine et la protéase de type XII d'*Aspergillus saitoi* (Sigma-Aldrich). Ces protéases sont assez peu spécifiques mais il a été montré qu'elles présentent une bonne reproductibilité de coupure sur les protéines de haut poids moléculaires (Cravello *et al.*, 2003). Ces deux enzymes sont actives à pH 2,2 et basse température quand les échanges isotopiques sont ralentis.

Les solutions de protéases sont préparées dans H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 110 mM et leur concentration finale est 1,7 mg.mL<sup>-1</sup> pour la pepsine et 16 mg.mL<sup>-1</sup> pour la protéase de type XIII. Elles sont également refroidies avant digestion enzymatique. La digestion enzymatique de



l'apomyoglobine dure 2 min. Elle est effectuée à pH 2,2 et les ratios protéase/protéine sont 1/1 (w/w) pour la pepsine et 15/1 pour la protéase de type XIII.

## **VI - Séparation des peptides par HPLC**

Afin de limiter les échanges H/D lors de la séparation, le système est refroidi à 0°C dans un bain de glace.

Les peptides issus des digestions peptidiques sont chargés sur une colonne MacroTrap (Michrom Bioresources, Auburn, CA) et dessalés par lavage de la colonne avec la solution HPLC A (0,03% (v/v) acide trifluoroacétique dans l'eau). Puis les peptides sont élués sur une colonne en phase inverse (C18) (1 mm x 100 mm ; Interchrom), cela permet également de séparer les peptides des lipides. La séparation se fait par un gradient linéaire allant de 15% à 40% (v/v) de solution B (95% acétonitrile, 0,03% acide trifluoroacétique (v/v)) en 20min et suivi d'une étape dans laquelle le gradient passe de 40% à 45% de solution B en 5min. Le débit sur la colonne est de 50  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . La colonne est préalablement équilibrée avec 15% (v/v) de solution B.

## **VII - Analyses par spectrométrie de masse**

### **VII.1 Principe**

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet de transformer des molécules neutres en ions gazeux afin de déterminer leur masse moléculaire en analysant leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Tous les spectromètres de masse possèdent trois parties distinctes : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur. La source d'ionisation permet d'ioniser les molécules à analyser. Les ions sont ensuite séparés dans l'analyseur selon leur rapport  $m/z$  puis un détecteur mesure les quantités respectives des ions séparés.

### **VII.2 Analyse par MALDI-TOF**

Un spectromètre de masse de type MALDI-TOF a été utilisé pour l'analyse des cinétiques d'échanges D/H globales. L'intérêt majeur de l'utilisation du MALDI est que la majorité

des ions produits sont monochargés. C'est un avantage non négligeable pour l'analyse de peptides complexes. De plus, cette technique présente l'avantage d'être compatible avec la présence de sels, de détergents, tampons. Ce qui évite une étape de dessalage avant analyse. La rapidité de la mesure est également un avantage considérable pour les expériences d'échanges H/D. Enfin, la concentration de matériel protéique nécessaire est assez faible ( $\sim 10$  pmoles. $\mu\text{L}^{-1}$ ).

Les cinétiques globales sont analysées par MALDI-TOF. Les échantillons précédemment congelés lors des expériences sont décongelés un par un à température ambiante. 0,5  $\mu\text{L}$  de l'échantillon est déposé sur la plaque métallique et mélangé avec 0,5  $\mu\text{L}$  d'acide sinapinique (matrice). Le séchage du mélange ainsi obtenu est réalisé sous flux d'azote afin d'accélérer la co-cristallisation de l'échantillon et de la matrice, afin de limiter les échanges H/D entre les deux solutions. L'analyse est ensuite effectuée sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Voyager Elite (Applied Biosystems). Les spectres sont obtenus en mode linéaire sur une gamme de masse de 8000 à 20 000 Da avec utilisation d'une calibration externe.

### **VII.3 Analyse par Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)**

Lors d'analyse par spectrométrie de masse en tandem, les ions (ou peptides issus de digestion enzymatique) sont tout d'abord séparés selon leur rapport  $m/z$  au niveau du premier analyseur. Les ions ayant un même rapport  $m/z$ , dits ions parents, entrent ensuite dans une chambre de collision dans laquelle ils sont fragmentés en ions fils. C'est au niveau du deuxième analyseur que les ions fils sont séparés.

Ce type d'analyse a été utilisé pour l'identification des fragments peptidiques issus des digestions enzymatiques lors de la cartographie de l'apomyoglobine et des cinétiques d'échanges D/H locales. Elles ont été effectuées sur un spectromètre de masse utilisant une source d'ionisation electrospray (ESI) et un analyseur de type piège à ions (trappe ionique). Ce type d'analyse permet d'avoir une plus grande précision dans la détermination de la masse des fragments peptidiques. Il nécessite cependant de séparer au préalable les lipides des peptides et ne tolère pas les sels contrairement au MALDI. Ainsi, après digestion enzymatique (cf. §III.V), dessalage et séparation (cf. §III.VI), les fragments peptidiques sont analysés par spectrométrie de masse en tandem. Le système HPLC est directement couplé à la source d'ionisation electrospray du spectromètre. Les analyses sont effectuées sur un spectromètre à trappe ionique (Esquire 3000+, Bruker Daltonics).





# *RESULTATS*



Le mécanisme d'action des toxines bactériennes de type AB comprend généralement un passage par le compartiment endosomal. Par conséquent l'interaction de ces toxines, en particulier leur domaine de translocation, est sensible au pH. D'autre part, le domaine de translocation devient fonctionnel à pH acide, c.à.d. à l'intérieur des endosomes tardifs. A ce stade, deux types de comportement peuvent être distingués: 1) Le domaine de translocation adopte un état partiellement replié apte à interagir avec la membrane, 2) l'état fonctionnel correspond à la formation d'une protéine transmembranaire résultant de l'oligomérisation du domaine. Dans ce dernier cas, l'oligomérisation est rendue possible par un changement de conformation local.

Le passage par un état partiellement replié capable d'interagir avec la bicouche lipidique est le mécanisme d'action adopté par la toxine diphtérique. Ainsi, avec l'acidification du pH, le domaine de translocation subit des changements conformationnels conduisant à un état sans structure tertiaire stable mais avec des structures secondaires similaires à celles de l'état natif, cet état est appelé le "globule fondu" ou encore le « molten-globule ». Cette dernière appellation sera utilisée dans la suite du manuscrit. Le domaine de translocation de la toxine diphtérique expose alors au solvant ses hélices hydrophobes. Ces dernières vont interagir avec les membranes et permettre le passage du domaine catalytique dans le cytosol de la cellule cible où il exercera son activité létale.

Une autre possibilité réside en l'oligomérisation de la partie B de ce type de toxine. C'est le cas de l'anthrax et de la toxine pertussique par exemple. La toxine pertussique est dite A<sub>1</sub>B<sub>5</sub>. Il est supposé que lors de son entrée dans la cellule, la chaîne A est clivée en deux chaînes reliées par un pont disulfure dont l'une porte l'activité enzymatique de la toxine et la seconde assure la liaison avec la partie B de la toxine. Le composant B se présente sous forme d'un pentamère et assure la fonction de liaison au récepteur mais également la translocation du domaine portant l'activité enzymatique de la toxine. Le pentamère forme un pore à travers la bicouche lipidique. Dans le cas de l'anthrax, les composants A et B sont synthétisés séparément. Dans ce cas, la partie B forme un heptamère et forme un pore à travers la bicouche lipidique. Ce n'est que lorsque l'oligomère est formé que l'interaction avec le composant A a lieu.

A ce jour, le mécanisme d'intoxication de la toxine botulique est peu caractérisé et le mode d'action du domaine de translocation n'est pas connu. Il est généralement accepté que la toxine passe par le compartiment endosomal. De récentes études indiquent que lors de l'étape de la translocation un pore se forme au travers des membranes des endosomes.

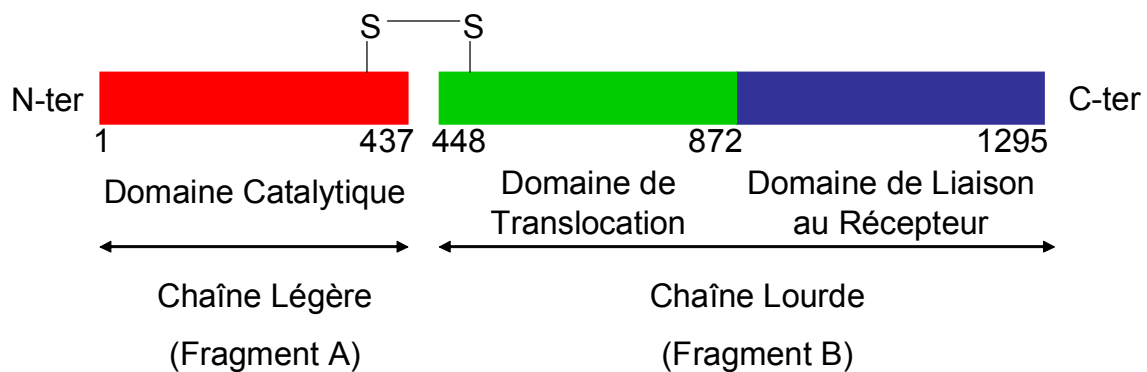
Cette étude comporte plusieurs objectifs: sensibilité au pH des interactions du domaine de translocation avec les membranes, caractériser les changements de structure impliqués, observer l'état fonctionnel du domaine et mettre en évidence les facteurs environnementaux ayant un effet sur sa fonction. Il s'agira notamment de déterminer si l'insertion du domaine de translocation passe par un état partiellement replié comme la toxine diphtérique ou par une oligomérisation comme l'anthrax. Pour ce faire, le domaine de translocation sera obtenu par expression hétérologue dans *E. Coli* et des vésicules lipidiques seront utilisées comme modèles de membrane.



**A - BIOLOGIE MOLECULAIRE**

**I - Stratégie initiale**

La stratégie initiale a été de cloner dans un vecteur pQE811, la séquence codant pour les domaines catalytique et de translocation de BoNT/A extraite du génome de *Clostridium botulinum* par PCR (Fig. 44). Notre but étant à terme d'étudier le comportement en solution et en présence de vésicules lipidiques du domaine de translocation, seul dans un premier temps puis associé au domaine catalytique (C+T) dans un deuxième temps.



*Figure 44 : Les trois domaines fonctionnels de BoNT/A. Après clivage protéolytique, la toxine botulique est dite « active ». Elle est alors constituée de deux chaînes polypeptidiques reliées par un pont disulfure. La chaîne légère est constituée du domaine catalytique dont la masse est de 50 kDa et la chaîne lourde est composée du domaine de liaison au récepteur et du domaine de translocation de masse moléculaire 50 kDa. La chaîne légère correspond au fragment A et la chaîne lourde au fragment B dans la nomenclature des toxines bactériennes à activité intracellulaire.*

Trois constructions ont été prévues pour le domaine de translocation. Elles sont nommées Ts, Tm et Tl pour "Translocation" « short », « medium » et « large » (Fig. 45). La protéine recombinante Tm correspond au domaine de translocation de la toxine active (454-877), Tl au domaine de translocation avant clivage protéolytique entre les domaines catalytique et de translocation (418-877) et Ts est le domaine de translocation de la toxine amputé de la boucle qui enserre le domaine catalytique (547-877). Il est à noter que les protéines recombinantes envisagées, notamment Tm, ne correspondent pas exactement au domaine de translocation de la toxine entière, en terme de longueur et de « bornes » entre les différents domaines (Fig. 1 et Fig. 2). Ce choix est fait pour respecter au mieux l'intégrité des structures secondaires présentes dans les zones « charnières » entre les

domaines, espérant ainsi obtenir un gain de stabilité structurale de la protéine recombinante. La production d'une protéine recombinante dans laquelle les domaines de translocation et catalytique sont associés est aussi envisagée.

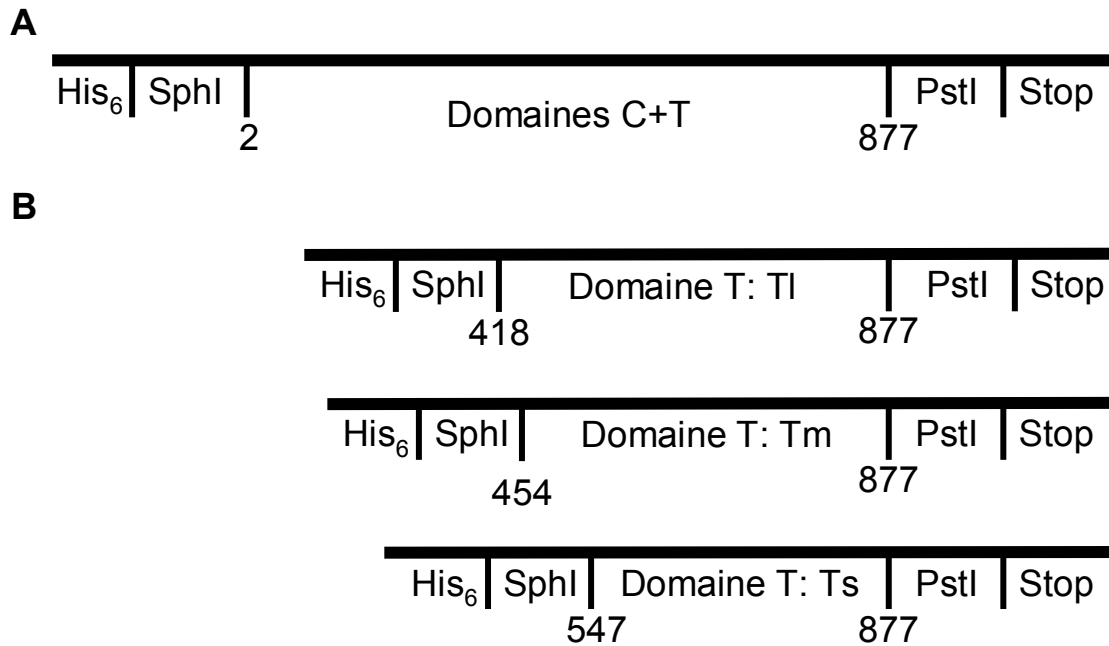
L'intérêt de l'étude des variants Ts et Tl du domaine de translocation est d'une part de déterminer si la boucle entourant le domaine catalytique joue un rôle dans la translocation (étude menée sur Ts). D'autre part, le feuillet  $\beta$  présent seulement dans la protéine recombinante Tl pourrait éventuellement agir comme un verrou dont « l'ouverture » contrôlerait les éventuels changements conformationnels nécessaires à l'interaction de la protéine avec les membranes.

Comme dans le cas des autres toxines AB, il est très probable que les différents domaines de la toxine botulique correspondent à des modules structuraux et fonctionnels indépendants (cf "Introduction"). D'après la structure obtenue par cristallographie, les trois domaines de BoNT/A sont des unités structurales indépendantes. Il semble donc raisonnable d'étudier le domaine de translocation indépendamment du reste de la toxine.

Le point de départ des expériences de biologie moléculaire a été l'article de Lacy et Stevens publié en 1997. Les auteurs avaient réussi à cloner la séquence codant pour le domaine de translocation de BoNT/A à partir de l'ADN génomique et à le produire sous forme de protéine recombinante dans *E. coli* malgré le fort taux de codons rares pour une expression dans ce système bactérien. Ils avaient également caractérisé la protéine recombinante en solution et effectué des expériences préliminaires de cristallisation. Cela laissait supposer de la faisabilité du projet.

## **II - Clonage de la séquence codant pour les domaines de translocation et catalytique de la toxine botulique**

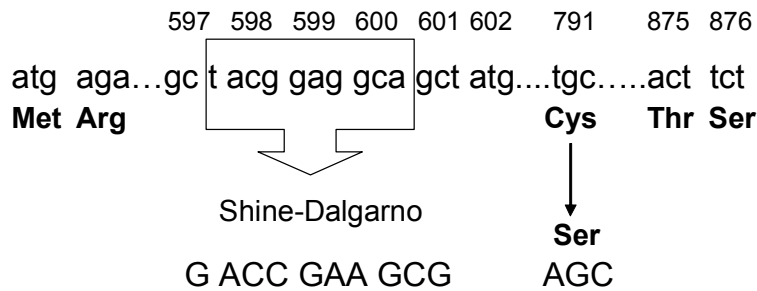
Le génôme de la souche Hall de *Clostridium botulinum* nous a été fourni par Michel Popoff de l'institut Pasteur. C'est à partir de ce génome que la séquence codant pour les domaines C+T a été extraite par PCR. Le fragment a ensuite été cloné dans un vecteur pQE811. Ce type de vecteur possède une séquence codant pour une étiquette 6-histidines qui se trouvera en 5' de l'insert. Ainsi, lors de son expression, la protéine recombinante possèdera une étiquette 6-histidine qui facilitera sa purification. Et il est inductible par l'IPTG.



**Figure 45 : Les différentes constructions prévues.** *A* Le produit de la PCR contient la séquence codant pour les domaines C+T, ce qui correspond dans la toxine entière aux acides aminés 2 à 877. L'insert est cloné dans le vecteur pQE811 en utilisant les enzymes de restriction SphI et PstI. Le vecteur possède une séquence codant pour une étiquette 6-histidines en 5' de l'insert. Cette étiquette sera utilisée lors de la purification. *B* les différentes constructions codant pour les trois formes de protéines recombinantes du domaine de translocation : Tl (acide aminé 418 à 877 dans la toxine entière), Tm (acide aminé 454 à 877) et Ts (acide aminé 547 à 877). Les trois produits de PCR correspondant à ces trois constructions sont également clonés dans un vecteur pQE811 en utilisant les enzymes de restriction SphI et PstI. De même, une séquence codant pour une étiquette 6-histidine est présente en amont de l'insert, sur le vecteur.

## II.1 - Mutations

L'insert contient une séquence analogue à la séquence de Shine-Dalgarno. Nous l'avons mutée afin d'éviter des départs illégitimes de traduction lors de la production de la protéine, qui pourraient conduire à la synthèse d'une protéine tronquée (Fig. 46). Nous avons également tenté de muter le codon codant pour la cystéine 791 en codon correspondant à une sérine, mais sans succès à ce stade.



**Figure 46 : Mutagenèse dirigée.** La mutagenèse dirigée est utilisée pour introduire une mutation silencieuse dans une séquence analogue à la séquence de Shine-Dalgarno. Ainsi que pour substituer une Sérine à une Cystéine en position 791 (numérotation pour la protéine entière). Les numéros indiquent la numérotation des acides aminés correspondant. Cette numérotation est celle de la toxine entière.

## **II.2 - Test de production de la protéine recombinante C+T**

En parallèle des essais de mutagenèse dirigée, un test de production de la protéine codant pour les domaines catalytique et de translocation est effectué. Des bactéries XL-1Blue ont été transformées avec le vecteur pQE811 contenant l'insert codant pour C+T. Malgré de nombreux essais d'optimisation du protocole (température, induction à différents stades de la croissance bactérienne) nous n'avons pas réussi à produire une quantité satisfaisante de protéines. De plus, au bout de 15 h d'induction la mesure de la densité optique à 600 nm indique une diminution de la biomasse, probablement due à une toxicité du produit.

## **III - Recours à l'utilisation d'un gène de synthèse**

Ces difficultés nous ont conduit à recourir à un gène de synthèse codant pour les résidus N418 à S877 de la BoNT/A. Ce gène de synthèse code pour la protéine nommée Tl. Le gène est cloné dans un vecteur pQE811, comme prévu dans la stratégie initiale (Fig. 45B). C'est à partir de ce gène de synthèse que seront effectuées les étapes nécessaires au clonage dans un vecteur pQE811 des séquences codant pour Tm et Ts (Fig. 45B).

Dans ce gène de synthèse plus de 50% des bases ont été modifiées par rapport à la séquence sauvage dans le but d'obtenir des codons fréquemment utilisés chez *E. coli*. Sur ce gène la séquence codant pour la cystéine 791 a été mutée de façon à coder pour une sérine. La séquence analogue à une séquence de Shine Dalgarno est également modifiée. Toutes les étapes de biologie moléculaire nécessaires à l'obtention des constructions

codant pour Tl, Tm et Ts ont été effectuées au sein du laboratoire de Daniel Gillet du CEA-Saclay. Les protocoles de production et de purification ont également été mis au point dans ce laboratoire.

## **IV - Production et purification**

### **IV.1 - Production et extraction des protéines**

La production des protéines recombinantes est réalisée dans *E.coli*. La souche utilisée est X11-blue. Les productions se font à 37°C sous agitation en présence de 1mM d'IPTG. Les bactéries sont lysées mécaniquement. Le lysat est ensuite centrifugé pour séparer la fraction soluble des corps d'inclusion. Les protéines sont retrouvées dans les corps d'inclusion d'où elles sont extraites grâce à un tampon contenant 8 M urée. L'urée permet de dénaturer les protéines agrégées dans les corps d'inclusion. Cette étape est un préliminaire indispensable à la purification des protéines recombinantes.

### **IV.2 - Purification des protéines recombinantes**

La purification comporte deux étapes principales de chromatographie qui sont dans un premier temps une chromatographie d'affinité puis une chromatographie d'exclusion.

- ***Chromatographie d'affinité***

Dans cette première étape la protéine est retenue sur la colonne de chromatographie par son étiquette "Histidines" puis éluée par une forte concentration d'imidazole (500 mM). Cette étape est effectuée en présence de 8 M urée. La protéine est donc dénaturée. L'élimination de l'urée et de l'imidazole se fait par trois dialyses successives contre du tampon NaP 20 mM à pH8. Ceci permet alors le repliement de la protéine.

- ***Chromatographie d'exclusion***

Les études biophysiques nécessitant une grande pureté des échantillons étudiés, une deuxième étape de chromatographie d'exclusion permet d'éliminer les protéines

contaminantes. La protéine est ensuite dessalée (remplacement du NaP par du  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) puis lyophilisée. Les protéines ainsi obtenues sont conservées à 4°C avant utilisation.

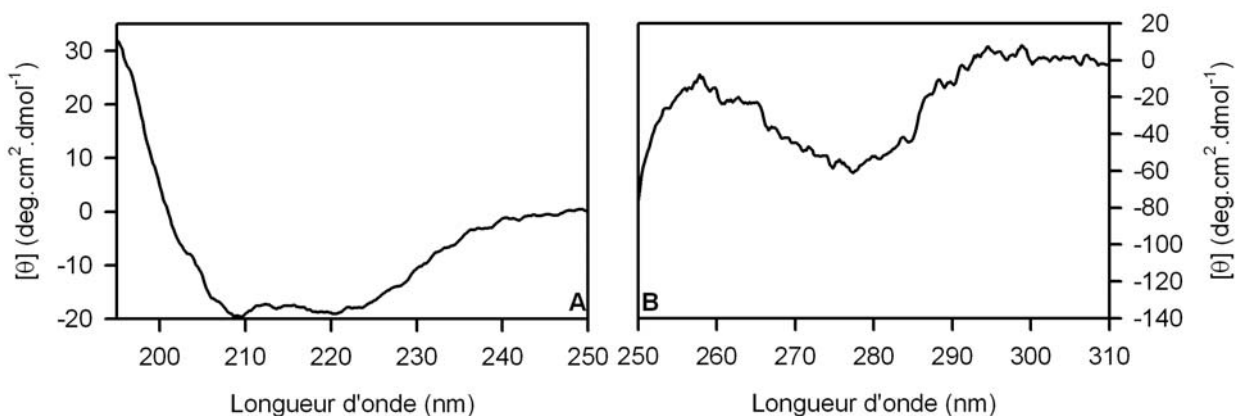
Dans ce manuscrit ne seront présentés que les résultats obtenus avec la protéine recombinante Tm avec laquelle l'étude a commencé et est, à ce jour, la plus avancée. Des études similaires sont actuellement en cours sur les protéines recombinantes Tl et Ts.

**B - CARACTERISATION DE Tm EN SOLUTION ET EN PRESENCE DE SURFACTANT FLUORE (C8FTAC)**

**I - Structure et solubilité**

**I.1 - Structure en solution à pH7**

La protéine recombinante Tm a été dénaturée puis repliée au cours de sa purification. C'est pourquoi il est nécessaire de vérifier qu'elle est correctement repliée à pH 7 après resuspension. Pour ce faire, une analyse par dichroïsme circulaire (CD) est effectuée. Cette technique spectroscopique apporte des renseignements sur les structures secondaire et tertiaire de la protéine. Les spectres de CD enregistrés dans l'UV lointain (190 nm-250 nm) donnent des indications sur la structure secondaire et les spectres obtenus dans l'UV proche (250 nm-320 nm) permettent de mettre en évidence la présence de structure tertiaire. Les spectres obtenus avec Tm à pH 7 indiquent que sa structure secondaire est majoritairement en hélice  $\alpha$  (Fig. 47A) et qu'elle possède une structure tertiaire (Fig. 47B). Par conséquent Tm est bien repliée à pH 7 et sa structure secondaire est corrélée avec celle décrite dans la structure cristallographique de la toxine entière (Lacy & Stevens, 1998).

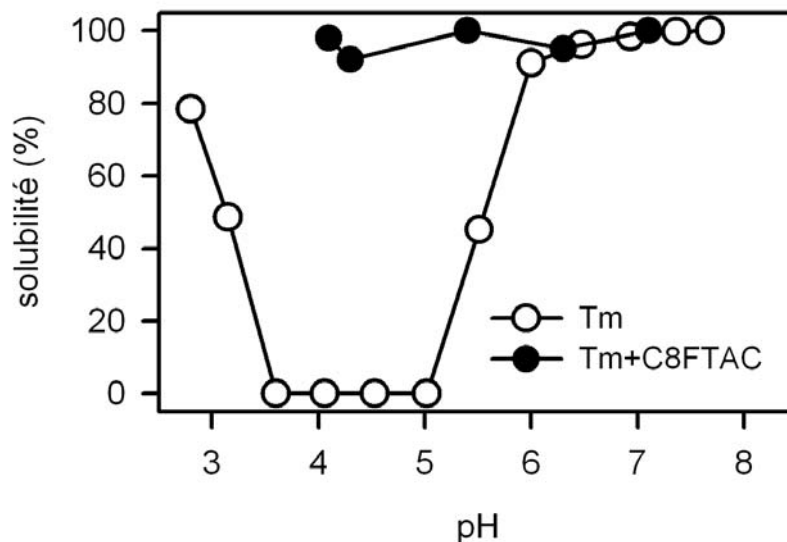


**Figure 47 : Spectres de dichroïsme circulaire de Tm en solution à pH7. A Spectre enregistré dans l'UV lointain. Les minima à 208 nm et 222 nm sont caractéristiques d'un repliement en hélices  $\alpha$ . La concentration de Tm est de 1  $\mu\text{M}$ . B Spectre enregistré dans l'UV proche. Le minimum aux alentours de 280 nm indique que la protéine possède une structure tertiaire dans ces conditions. La concentration de Tm est de 4  $\mu\text{M}$ .**

## I.2 - Solubilité en fonction du pH

Des tests de solubilité de la protéine recombinante Tm en fonction du pH ont été effectués. La gamme de pH utilisée (pH 8-pH 3) recouvre la gamme de pH retrouvée dans le compartiment endosomal à partir duquel le domaine catalytique de certaines toxines AB passe dans le cytosol de la cellule hôte grâce à l'interaction du domaine de translocation avec les membranes à pH acide.

Ces tests de solubilité sont réalisés en solubilisant la protéine dans un tampon Ci/P 10mM au pH souhaité. Le rapport des intensités de fluorescence du Trp avant et après une étape de centrifugation (13 000 rpm sur une centrifugeuse de paillasse) permet de déterminer la proportion de protéine solubilisée pour chaque condition de pH. Les résultats obtenus sont représentés en pourcentage de solubilité en fonction du pH (Fig. 48).



**Figure 48 :** Dépendance en pH de la solubilité de Tm seule en solution ou en présence de 0,15mM de C8FTAC. La solubilité est quantifiée par le ratio des intensités de fluorescence du Trp des solutions de protéines avant et après centrifugation aux différents pHs. La courbe ○ représente les résultats obtenus pour Tm (0,45 μM) seul en solution dans un tampon Ci/P 10 mM. La courbe ● représente la même expérience réalisée pour Tm (0,45 μM) en présence de 0,15 mM C8FTAC dans du tampon Ci/P 10 mM.

Le graphique représenté par les cercles ○ dans la Figure 48 indique que la protéine n'est pas complètement soluble dans un tampon aqueux sur une large gamme de pH comprise entre pH 6 et pH 3. De plus, Tm est complètement insoluble entre pH 5 et pH 3,6. Cela rend impossible l'étude de la protéine seule en solution en fonction du pH. Afin de palier à ce problème, nous avons eu recours à un surfactant fluoré, le C8FTAC (Fig. 49).



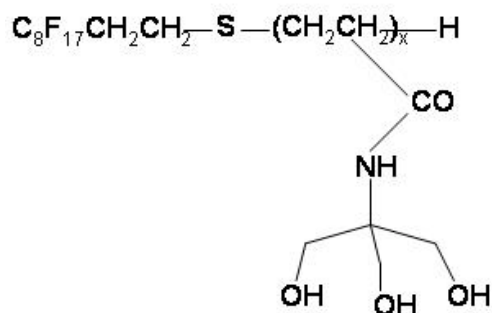
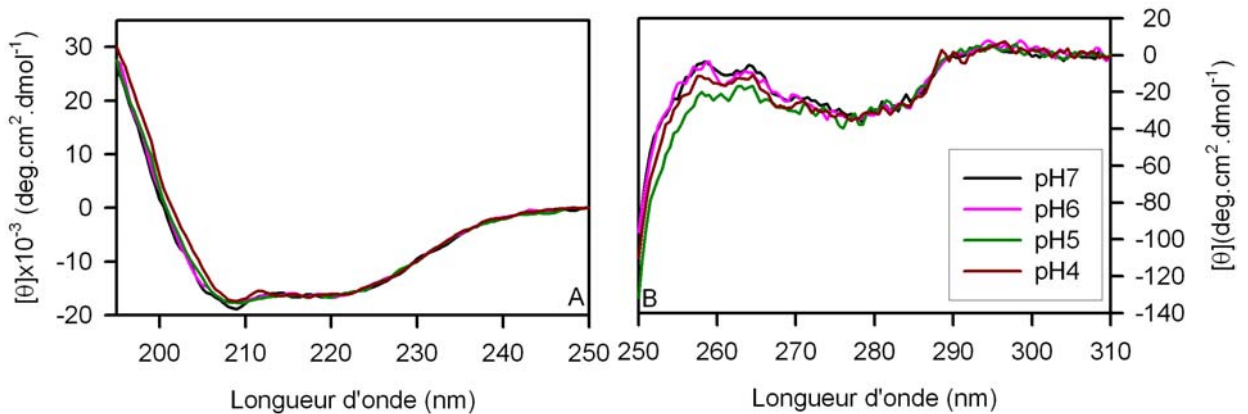


Figure 49 : Formule du surfactant fluoré C8FTAC.

Le recours au C8FTAC permet la solubilisation de Tm sur la gamme de pH d'intérêt pour notre étude, c.à.d. entre pH 7 et pH 4 (Fig. 48 ●). La partie hydrophobe de ce surfactant est fluorée. Cela a pour conséquence de rendre le surfactant lipophile. Ainsi, le C8FTAC ne peut interagir avec les bicouches lipidiques. Par conséquent, il respecte l'intégrité des membranes lipidiques tout en permettant la solubilisation des protéines membranaires (Breyton *et al.*, 2004). Il est donc possible de reconstituer directement une protéine membranaire en protéoliposomes ou d'étudier des interactions protéine/membrane sans avoir à éliminer le surfactant au préalable (Palchevskyy *et al.*, 2006). Ce surfactant est utilisé lors des expériences effectuées avec Tm en absence de vésicules lipidiques.

### I.3 - Structure en fonction du pH en présence C8FTAC

Le dichroïsme circulaire est utilisé pour observer si Tm conserve sa structure tertiaire avec l'acidification du pH (UV proche : 250-320 nm) et pour suivre l'évolution des structures secondaires (UV-lointain : 195-250 nm). Tous les spectres sont enregistrés en présence de surfactant fluoré afin de garantir la solubilité de la protéine entre pH 7 et pH 4. Les spectres obtenus à pH 7 (Fig. 50) sont semblables à ceux observés pour Tm en solution (Fig. 47). En conséquence, le surfactant n'a pas d'effet notable sur la structure de Tm. L'utilisation du C8FTAC a permis d'enregistrer des spectres dans l'UV lointain et dans l'UV proche pour différents pHs entre pH 7 et pH 4 (Fig. 50). Que ce soit dans l'UV lointain (structure secondaire) ou dans l'UV proche (structure tertiaire), aucun changement significatif n'est observé avec l'acidification du pH. Par conséquent la structure de Tm n'est pas sensible à l'acidification du milieu.



**Figure 50 :** Spectres de dichroïsme circulaire de *Tm* en solution en présence de C8FTAC (0,15 mM), en fonction du pH. **A** UV-lointain. La concentration de *Tm* est de 0,5  $\mu$ M. Les spectres sont caractéristiques d'une protéine repliée en hélice alpha, avec les minima à 208 nm et 222 nm. *Tm* conserve ses structures secondaires même à pH acide. **B** UV-proche. La concentration de *Tm* est de 4  $\mu$ M dans ce cas. Les spectres réalisés dans l'UV-proche donnent des informations sur la structure tertiaire de la protéine. Pas de variation significative de la structure tertiaire de *Tm* avec l'acidification du pH. *Tm* conserve sa structure native à pH acide en présence du surfactant fluoré C8FTAC.

Le domaine de translocation de la toxine botulique ne subit donc pas de changement conformationnel majeur détectable par dichroïsme circulaire, avec l'acidification du pH. Cependant, il se peut que la protéine subisse des changements conformationnels que cette technique spectroscopique ne permet pas de détecter. Il peut s'agir de changements de structures très localisés, des modifications de la dynamique interne de la protéine ou encore de la formation d'une structure quaternaire due à une oligomérisation. Cependant, à ce stade, il est déjà possible de conclure que le domaine de translocation de la toxine botulique n'adopte pas un état partiellement replié comme celui décrit pour la toxine diphtérique.

**C - CARACTERISATION DU COMPORTEMENT DE Tm EN PRESENCE DE VESICULES LIPIDIQUES**

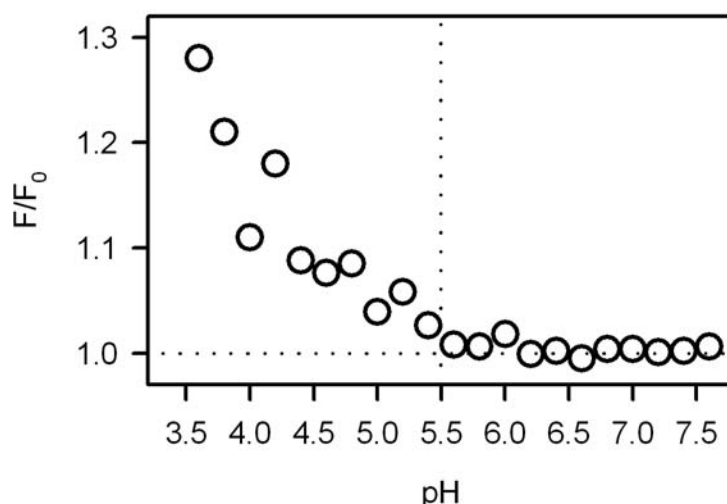
**I - Caractérisation de l'interaction de Tm avec la bicouche lipidique**

Nous nous sommes ensuite intéressés à la caractérisation de l'interaction de Tm avec les membranes. Notre première approche a consisté à faire varier le pH du milieu lors de la mise en présence de Tm avec des vésicules lipidiques. Cette approche est assez classique pour ce type de toxine. En effet, le mécanisme d'internalisation de ce type de toxine implique souvent un routage par les endosomes. Et c'est l'acidification du pH endosomal qui provoque des changements conformationnels du domaine de translocation qui est alors capable d'interagir avec la membrane de l'endosome et de la perméabiliser pour permettre la translocation du domaine catalytique dans le cytosol. C'est pourquoi l'influence du pH dans l'interaction de Tm avec les membranes est étudiée.

Dans un premier temps, des expériences de partition physique de la protéine dans les membranes suivie par ultracentrifugation ont été réalisées. Ce type d'expérience est basé sur la séparation par ultracentrifugation des protéines liées aux vésicules de celles restées en solution. Après centrifugation, les protéines liées aux vésicules lipidiques doivent être retrouvées dans le culot et les non liées dans le surnageant. Nous avons employé deux contrôles pour tester la validité de ce protocole expérimental. A la vitesse de centrifugation considérée, nous avons vérifié (1) que les vésicules lipidiques seules sédimentent et (2) que la protéine en présence de C8FTAC reste dans le surnageant. Malgré de nombreux essais d'optimisation du protocole, consistant notamment en la diminution de la vitesse de centrifugation (de 350 000g à 60 000g) et en des ajouts de lipides bromés augmentant la densité des vésicules lipidiques, nous n'avons pu obtenir de résultats permettant de remplir les deux conditions. En effet, dans nos expériences contrôles, Tm est toujours retrouvée dans le culot après centrifugation aux vitesses nécessaires pour la sédimentation des vésicules.

• **FRET (Förster Resonance Energy Transfer)**

La partition suivie par centrifugation n'étant pas applicable dans ce cas, il a fallu recourir à une méthode moins directe pour mettre en évidence les interactions entre Tm et les vésicules lipidiques. Nous avons choisi le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) entre les tryptophanes de la protéine et un lipide marqué sur sa tête polaire avec un fluorophore. Le FRET est une technique qui permet de détecter la proximité entre deux molécules fluorescentes, dans le cas présent la protéine et plus précisément ses tryptophanes et le groupement Dansyl greffé sur la tête polaire d'un phospholipide à éthanolamine (Dansyl-DHPE : N-(5-diméthylmaminonaphtalene-1-sulfonyl)-1-2dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine triéthylammonium salt).



**Figure 51 : Evolution du FRET Trp/Dansyl-DHPE en fonction du pH.** Tm (0,1  $\mu$ M) est en présence de LUVs EPC/EPA/Dansyl-DHPE (9 :1 :0,5) à un ratio molaire Lipides/Protéines L/P 100. F/F<sub>0</sub> est le ratio d'intensités de fluorescence du Dansyl-DHPE après ajout de protéine (F) et avant ajout de la protéine (F<sub>0</sub>). Les intensités de fluorescence sont mesurées à 520 nm.

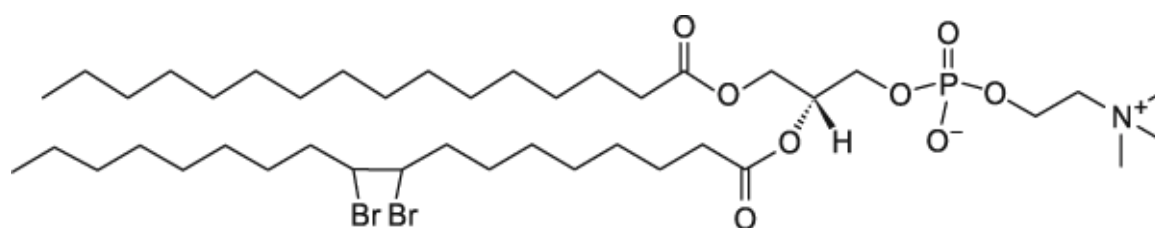
La Figure 51 montre l'évolution du ratio F/F<sub>0</sub> en fonction du pH. F<sub>0</sub> est l'intensité de fluorescence des LUVs anioniques (EPC/EPA/Dansyl-DHPE 9 :1 :0,5) de 170 nm de diamètre, mesurée à 520 nm et F est l'intensité de fluorescence au plateau, après ajout de Tm. Le ratio F/F<sub>0</sub> reste constant et égal à 1 entre pH 7 et pH 5,5. Cela indique qu'il n'y a pas de FRET entre les tryptophanes de Tm et les groupements Dansyl des têtes polaires des lipides phosphatidyléthanolamine. Pour des valeurs de pH inférieures à 5,5, l'augmentation du ratio F/F<sub>0</sub> indique une proximité entre les tryptophanes de Tm et les groupements Dansyl. Le ratio atteint un maximum de 1,28 à pH 3,6.

Le ratio croît avec l'acidification du pH montrant une proximité entre Tm et la bicouche lipidique plus grande à pH acide. L'interaction de Tm avec les membranes est donc dépendante du pH et intervient à pH acide.

- **Extinction de fluorescence intrinsèque des protéines par des lipides bromés**

Afin de confirmer la dépendance en pH de l'interaction de Tm avec la bicouche lipidique ainsi que l'éventuelle implication d'interactions de type électrostatique dans la liaison de Tm aux membranes, des expériences d'extinction de fluorescence du tryptophane par le brome ont été réalisées.

Le brome est un inhibiteur à courte distance (10 Å) de la fluorescence du tryptophane. Ainsi lorsque un tryptophane se trouve à proximité d'un atome de brome, son intensité de fluorescence diminue. Les lipides bromés utilisés dans ces expériences (Fig. 52) possèdent des atomes de bromes liés de façon covalente à leur chaîne aliphatique. L'extinction de fluorescence du tryptophane par les atomes de brome de ces lipides attestera donc de l'interaction de Tm à le coeur hydrophobe de la bicouche lipidique.



**Figure 52 : Exemple de lipide bromé utilisé lors des expériences d'inhibition de fluorescence.** Les atomes de Brome substituent des hydrogènes sur la chaîne aliphatique. Ici les atomes de Brome sont positionnés sur les Carbones 9 et 10. Le phospholipide représenté est un 1-Palmitoyl-2-Stearoyl(9-10)dibromo-sn-Glycero-3-Phosphocholine.

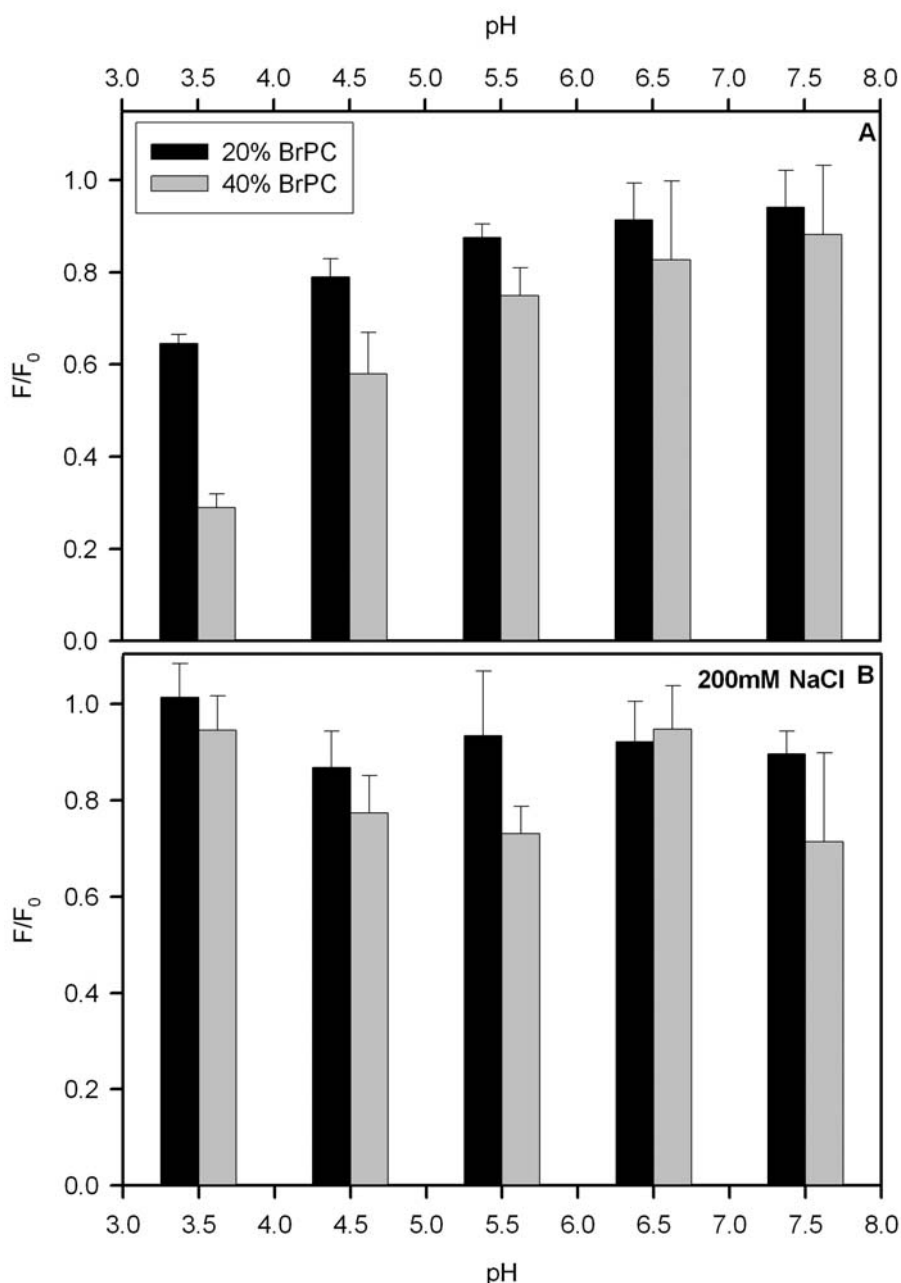
Les vésicules lipidiques utilisées dans la cas présent, sont des LUVs anioniques EPC/EPA/(9-10BR)-PC aux ratios molaires 7 :1 :2 et 5 :1 :4. L'utilisation de deux proportions différentes de lipides bromés permet de confirmer la liaison de la protéine à la membrane; l'extinction de fluorescence doit être plus forte en présence d'un ratio molaire plus grand de lipides bromés.

Lors des expériences, nous enregistrons des spectres de fluorescence intrinsèque de Tm dans différentes conditions de pH. La protéine (1 µM final) est mise en présence de LUVs anioniques à un ratio molaire de L/P 500 et laissée à incuber pendant 2 h. Pour la mesure de l'extinction de fluorescence due à la proximité des tryptophanes de Tm et des bromes

des phospholipides, le spectre de fluorescence en présence des LUVs enregistré pour chaque pH sert de référence. L'intensité de fluorescence observée à 350 nm, appelée  $F_0$ , correspond à la valeur en absence d'inhibition par le brome. Par la suite, des spectres en présence de LUVs contenant 20 % et 40 % de lipides bromés sont enregistrés et la valeur de leur intensité à 350 nm, appelée  $F$ , est relevée. Le rapport  $F/F_0$  permet l'estimation de l'inhibition de la fluorescence due aux phospholipides bromés. En conséquence, lorsque le ratio  $F/F_0$  est égal à 1, il n'y a pas d'extinction de la fluorescence du Trp. Au contraire, lorsque ce rapport est inférieur à 1 l'intensité de fluorescence est plus faible dans la condition étudiée : il y a extinction de fluorescence du Trp par les atomes de brome portés par les phospholipides bromés. Les mesures ont été effectuées sur une gamme de pH allant de pH 7,5 à pH 3,5. Les résultats présentés dans la Figure 53 sont la moyenne de cinq mesures différentes. L'erreur représente l'écart type pour le pH étudié.

Le ratio  $F/F_0$  n'évolue pas de façon significative entre pH 7,5 et pH 6,5 et reste proche de 1 (Fig. 53A). C'est autour de pH 5,5 que ce rapport commence à diminuer et l'effet maximal est observé à pH 3,5. Dans ces conditions, le rapport  $F/F_0$  vaut 0,65 et 0,30 en présence de vésicules lipidiques contenant respectivement 20 % et 40 % de lipides bromés.

Ainsi, le rapport d'intensité de fluorescence à 350 nm reste proche de 1 entre pH 7,5 et pH 6,5. Cela indique que dans cette gamme de pH les tryptophanes de Tm ne sont pas à proximité de atomes de brome des lipides bromés. Par conséquent Tm n'est pas lié à la membrane dans cette gamme de pH. Le ratio  $F/F_0$  diminue à partir de pH 5,5 et sa valeur devient d'autant plus faible que le pH est acide. Par conséquent, la distance entre les tryptophanes de Tm et les atomes de bromes diminue lors de l'acidification du pH. Ces résultats confirment donc la dépendance en pH de l'interaction de Tm avec la bicouche lipidique anioniques.



**Figure 53 : Expériences d’extinction de fluorescence du tryptophane en fonction du pH.** *A* Les expériences sont effectuées à un ratio molaire L/P 500 et à une concentration finale de Tm de 1µM. Trois types de LUVs anioniques sont utilisés : EPC/EPA (9 :1) ; EPC/EPA/(9-10BR)-PC (7 :1 :2) et EPC/EPA/(9-10BR)-PC (5 :1 :4). F<sub>0</sub> représente l’intensité de fluorescence mesurée à 350 nm pour Tm en présence de LUVs EPC/EPA (9 :1) et F l’intensité de fluorescence à 350 nm pour Tm en présence de LUVs contenant des lipides bromés. L’histogramme représente ce rapport en fonction du pH pour Tm en présence de LUVs anioniques contenant 20% (noir) et 40 % de lipides bromés. *B* Les échantillons utilisés dans l’expérience présentée en *A* sont ensuite incubés sur la nuit à température ambiante avec 200 mM NaCl.

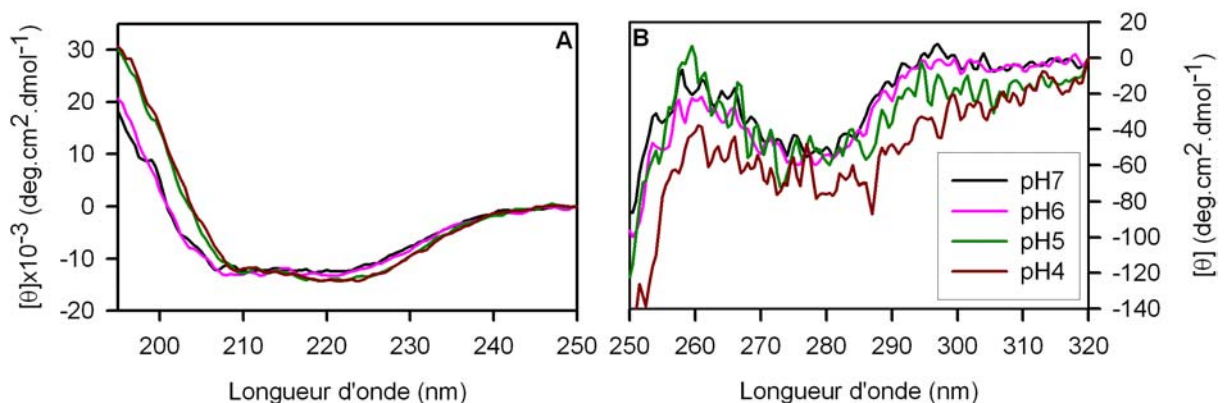
Après mesure, les échantillons sont incubés en présence de 200 mM NaCl pendant la nuit à température ambiante (Fig. 53B). L’ajout de NaCl a pour effet d’inhiber les interactions de type électrostatiques attractives potentiellement impliquées dans la liaison protéine/membrane. Dans le cas présent, les ratios F/F<sub>0</sub> sont similaires quel que soit le pH

entre pH 7,5 et pH 3,5 et restent proche de 1. L'ajout de NaCl a donc permis de lever l'interaction entre Tm et la bicouche lipidique. Ceci suggère que les interactions électrostatiques ont un rôle prépondérant dans la liaison de Tm à la bicouche lipidique anionique.

## II - Caractérisation structurale

### II.1 - Dichroïsme circulaire

Nous nous sommes attachés à observer les changements possibles de structure secondaire et tertiaire de Tm en présence de LUVs anioniques en fonction du pH. Il s'agit de mettre en évidence des changements de structure dus à l'interaction de Tm avec les membranes. Ces changements peuvent aller jusqu'à la perte de structure tertiaire comme dans le cas de la toxine diphtérique ou des colicines.



**Figure 54 : Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain de Tm en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA ; 9 :1) à un ratio molaire L/P 500 en fonction du pH. A Spectres réalisés dans l'UV lointain. La concentration de Tm est de 0,5  $\mu\text{M}$ . Les minima observés à 208 nm et 222 nm sont caractéristiques d'une protéines dont le repliement est en hélice  $\alpha$ . B Spectres réalisés dans l'UV proche. La concentration de Tm est de 4  $\mu\text{M}$ .**

Des spectres de dichroïsme circulaire de Tm en présence de LUVs anioniques ont été enregistrés pour des pH compris entre 7 et 4. La structure secondaire de Tm reste inchangée de pH 7 à pH 6, comme le montrent les spectres réalisés dans l'UV lointain (Fig. 54A). Ces spectres montrent que Tm possède toujours une structure secondaire en hélice  $\alpha$ , avec des minima à 222 nm et 208 nm similaires à ceux obtenus pour la protéine seule en solution à pH 7 (Fig. 54A). Pour des valeurs de pH plus acides (pH 5 et pH 4), les spectres ne sont pas parfaitement superposés à ceux obtenus à pH neutre. Le minimum



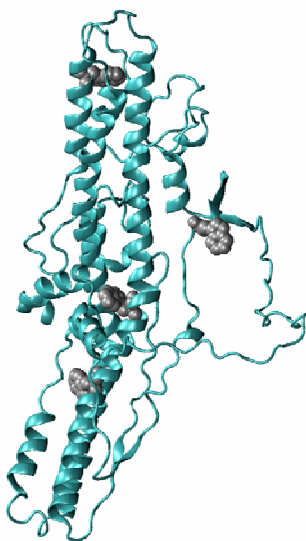
observé à 222 nm est légèrement plus prononcé à pH acide et le minimum à 208 nm observé à pH 7 est décalé à 210 nm. Néanmoins, la structure secondaire reste majoritairement en hélice  $\alpha$  à pH acide. Il existe deux possibilités pour expliquer ces légères différences. Il est possible que les hélices  $\alpha$  deviennent plus "rigides" à pH acide. Cependant, cette différence pourrait également être un artefact dû à une augmentation de la diffusion de la lumière par les LUVs à pH acide. Par conséquent nous considérerons que ces variations ne sont pas significatives.

Les spectres enregistrés dans l'UV proche (Fig. 54B) sont bruités, tout comme ceux réalisés dans l'UV lointain. Cela est dû à la diffusion de la lumière par les vésicules lipidiques qui sont des objets relativement gros (170 nm de diamètre dans ce cas). Néanmoins les spectres dans l'UV proche montrent que Tm, en présence de vésicules lipidiques conserve sa structure tertiaire quel que soit le pH entre 7 et 4.

Ainsi, le domaine de translocation de BoNT/A conserve une structure secondaire et tertiaire en présence de LUVs et ce, même pour des valeurs de pH acides. De plus, les structures secondaires et tertiaires de Tm ne varient que très peu avec l'acidification du pH en présence de vésicules lipidiques anioniques.

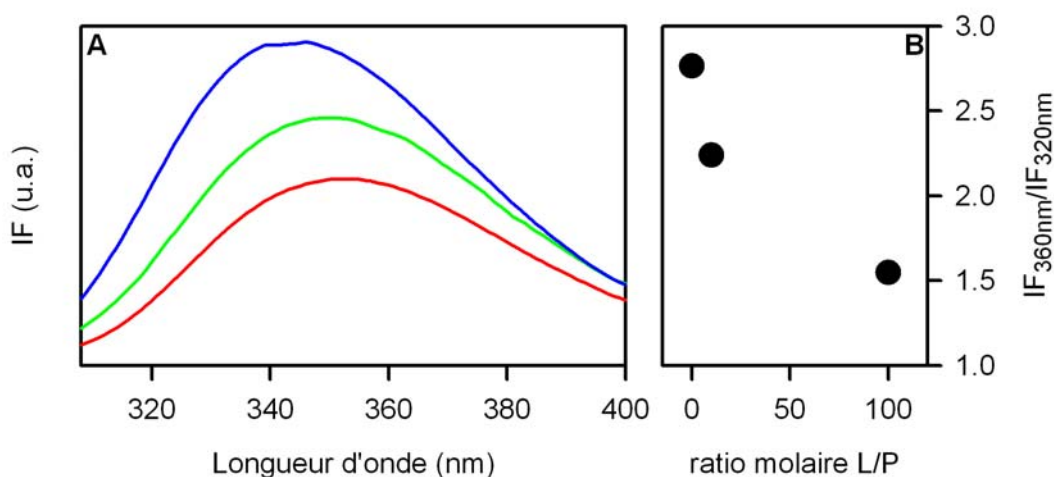
### **II.2 - Fluorescence intrinsèque du tryptophane**

La protéine Tm comporte 4 Tryptophanes (Fig. 55). Ces acides aminés possèdent un cycle aromatique dans leur chaîne latérale qui leur donne la propriété de fluorescer.



*Figure 55 : Représentation du domaine de translocation de BoNT/A d'après la structure cristalline de la PDB Id 3BTA. Les tryptophanes sont représentés en gris. Trois des tryptophanes sont situés à l'interface entre deux hélices. Le quatrième est sur la boucle enserrant le domaine catalytique dans la toxine entière.*

Cette fluorescence est sensible à l'environnement des tryptophanes (Fig. 56). Ainsi, lorsqu'ils se trouvent dans un environnement polaire, la valeur de la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence ( $\lambda_{\max}$ ) se situe aux alentours de 350-355 nm. Lorsque l'environnement des Tryptophanes est apolaire, le  $\lambda_{\max}$  prend alors une valeur avoisinant 330 nm (Fig. 56A). D'autre part, l'environnement du tryptophane influence également sur l'intensité de fluorescence au  $\lambda_{\max}$ . Ainsi, plus l'environnement est apolaire, plus la valeur de l'intensité de fluorescence est grande.

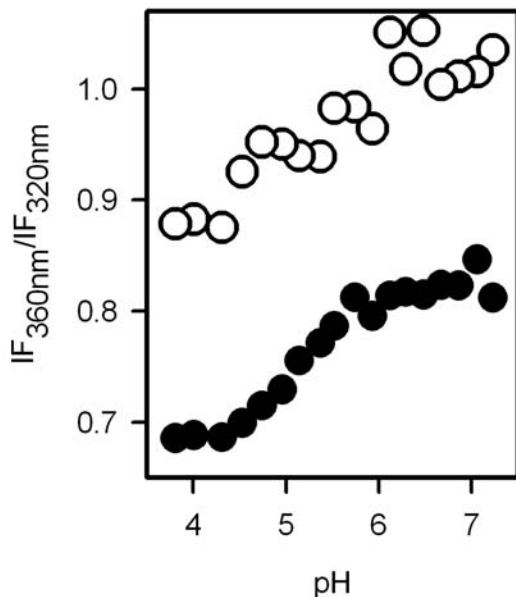


**Figure 56 : Exemple de spectres de fluorescence intrinsèque d'une protéine et de l'évolution du rapport  $IF_{360\text{ nm}}/IF_{320\text{ nm}}$ .** Ces données ont été obtenues à partir de spectres de fluorescence intrinsèque d'un peptide issu du domaine de translocation de la toxine diphtérique (données non publiées). Ces mesures ont été effectuées à pH 4 à différents ratios molaires Lipides/Protéines (L/P). Ces conditions de pH sont favorables à l'interaction du peptide avec la bicouche lipidique. **A** L'intensité de fluorescence est reportée en fonction de la longueur d'onde. La longueur maximale d'émission de fluorescence du tryptophane ( $\lambda_{\max}$ ) a une valeur proche de 350 nm lorsque l'environnement du Trp est polaire (spectre rouge, peptide en solution). Cette valeur est sensible à l'environnement du Trp. Elle est décalé vers des valeurs plus faibles lorsque l'environnement du Trp devient plus apolaire (spectres vert et bleu, peptide en interaction avec la bicouche lipidique) pour atteindre des valeurs pouvant aller jusqu'à 330 nm. D'autre part, l'intensité de fluorescence du Trp est elle aussi sensible à son environnement. Dans ce cas, elle est plus forte lorsque l'environnement du Trp est plus apolaire. **B** Evolution du rapport  $IF_{360\text{ nm}}/IF_{320\text{ nm}}$  en fonction du ratio molaire L/P. La diminution du rapport  $IF_{360\text{ nm}}/IF_{320\text{ nm}}$  indique que l'environnement du Trp devient plus apolaire. Dans ce cas, il montre l'interaction du peptide avec la bicouche lipidique.

Il existe un autre moyen de suivre l'évolution de l'environnement du Trp. Il s'agit du suivi du ratio d'intensités de fluorescence à 360 nm et 320 nm ( $IF_{360\text{nm}}/IF_{320\text{nm}}$ ) (Fig. 56B). Ces longueurs d'onde sont situées de part et d'autre du  $\lambda_{\max}$  du spectre d'émission de fluorescence, quel que soit son environnement. Ce ratio permet de suivre plus précisément les déplacements du spectre d'émission de fluorescence dus aux variations d'environnement des Tryptophanes, que le suivi du  $\lambda_{\max}$ . En effet, il n'est pas toujours aisé de déterminer la valeur du  $\lambda_{\max}$  sur un spectre de fluorescence, notamment

lorsque la protéine est en présence de vésicules lipidiques. L'augmentation du ratio  $IF_{360nm}/IF_{320nm}$  indique que l'environnement dans lequel se trouvent les tryptophanes de la protéine devient plus polaire. A contrario, lorsque ce ratio diminue l'environnement des tryptophanes est plus apolaire.

Le suivi du ratio  $IF_{360nm}/IF_{320nm}$  nous indique que, en présence de C8FTAC, l'environnement des Trps de Tm (Fig. 55) évolue en fonction du pH (Fig. 57 ○). En effet la valeur de ce ratio passe de 1,00 à pH 7 à 0,88 à pH 4, ce qui correspond à un changement du  $\lambda_{max}$  de 338 nm à 336 nm. Cette diminution indique que l'environnement des Trps de Tm devient légèrement plus apolaire avec l'acidification du pH. L'utilisation du surfactant fluoré garantit la solubilité de Tm sur la gamme de pH étudiée et les spectres de dichroïsme circulaire indiquent que ce surfactant n'influe pas sur la structure de Tm. L'évolution de l'environnement des tryptophanes n'est probablement pas causée par des changements de structure. Il est vraisemblable qu'avec l'acidification du pH, la compaction de Tm augmente, confinant ses Trps dans un environnement plus hydrophobe qu'à pH 7. Des changements dans la structure quaternaire de Tm survenant avec l'acidification du pH pourraient également expliquer cet effet.



*Figure 57 : Dépendance en pH de l'environnement des Trps de Tm (0,5 $\mu$ M) en présence de C8FTAC (0,15mM) (○) ou en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA 9 :1) à un ratio molaire L/P 500 (●). La fluorescence du Trp est sensible à son environnement. Le suivi de l'évolution des ratios des intensités de fluorescence à 360nm et 320nm ( $IF_{360nm}/IF_{320nm}$ ) donne des indications sur l'environnement des Trps. La diminution de ce ratio indique que l'environnement des Trps devient plus apolaire.*

Nous nous sommes ensuite intéressés aux changements d'environnement des Trps de Tm en présence de LUVs anioniques (Fig. 57). Le ratio  $IF_{360nm}/IF_{320nm}$  diminue avec l'acidification du pH, lorsque Tm est en présence de LUVs anioniques (Fig.57 ●). Ainsi, le ratio est de 0,82 à pH 7 et atteint 0,69 à pH 4, ce qui correspond à des  $\lambda_{max}$  de 336 nm et

334 nm respectivement. Tout comme pour Tm en présence de C8FTAC, cette variation indique que l'environnement des tryptophanes de Tm en présence de vésicules lipidiques devient plus apolaire avec l'acidification du milieu. Les amplitudes de variation sont similaires en présence de C8FTAC et de LUVs anioniques. On peut toutefois remarquer que les valeurs en présence de C8FTAC sont déplacées par rapport à celles obtenues en présence de LUV. Ceci nous indique que les tryptophanes sont dans un environnement légèrement plus polaires en présence de surfactant. Dans le cas de Tm seul en solution à pH 7, le  $\lambda_{\max}$  est de 336 nm, comme en présence de LUVs. Par conséquent, il semble que C8FTAC a un petit effet sur la compaction de Tm. Comme décrit plus haut, il n'est pas possible de déterminer si l'effet induit par l'acidification du milieu en présence de LUVs est dû à un changement de compacité de Tm ou à la formation d'une structure quaternaire. Dans le cas des LUVs, il est également possible qu'un tel changement d'environnement des tryptophanes soit le résultat de l'insertion de Tm dans la bicouche lipidique. A ce stade nous ne pouvons pas faire la distinction entre ces trois possibilités. D'autres méthodes vont être nécessaires.

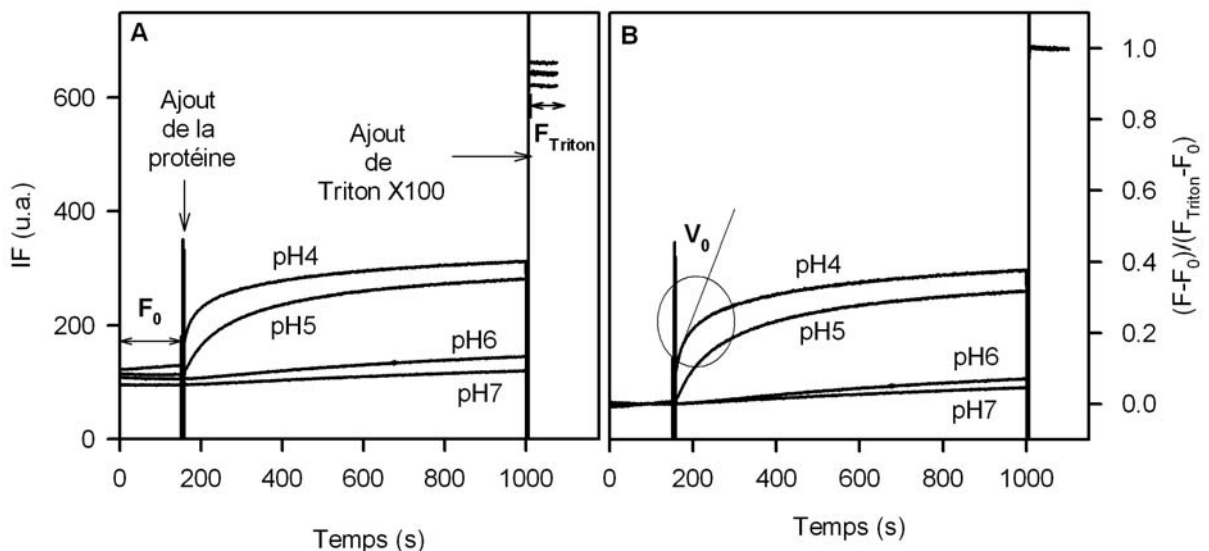
### **II.3 - Perméabilisation de vésicules lipidiques**

- ***Influence du pH***

L'interaction du domaine de translocation de la toxine botulique avec les membranes est donc dépendante du pH. Cette caractéristique est commune aux toxines de type AB. La perméabilisation des membranes lipidiques est une étape cruciale dans le processus d'intoxication des cellules hôtes par ces toxines. Cette étape conduit à la translocation du domaine catalytique (porteur de l'activité de la toxine) dans le cytosol où il accomplira son activité. Il est donc important de déterminer les conditions propices à la perméabilisation des membranes lipidiques par le domaine de translocation de la toxine botulique.

Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de perméabilisation de vésicules lipidiques en fonction du pH. Un fluorophore, la sulforhodamine B, est encapsulé dans les vésicules lipidiques à une concentration telle qu'il y a auto-extinction de la fluorescence. Lors de la perméabilisation des membranes par la protéine, la sulforhodamine B est libérée dans le milieu et fluoresce à nouveau. C'est la libération du fluorophore qui est observée en

fonction du temps. Ainsi observe-t-on l'évolution de l'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B en fonction du temps après ajout de la protéine (Fig. 58A). Dans un premier temps, la fluorescence des vésicules lipidiques dans lesquelles est encapsulée la sulforhodamine B est mesurée pendant 150 s environ. L'intensité de fluorescence moyennée sur 60 s avant ajout de Tm est appelée  $F_0$ , elle servira de référence en tant que plus faible intensité de fluorescence de la sulforhodamine B dans la condition testée. La protéine est ensuite ajoutée et l'intensité de fluorescence  $F$  de la sulforhodamine B est mesurée pendant 1200 s environ. Enfin, du Triton X100 est ajouté au milieu afin de lyser toutes les vésicules lipidiques, libérant par conséquent toute la sulforhodamine B. L'intensité de fluorescence  $F_{\text{Triton}}$  mesurée alors représente le maximum d'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B dans la condition testée.

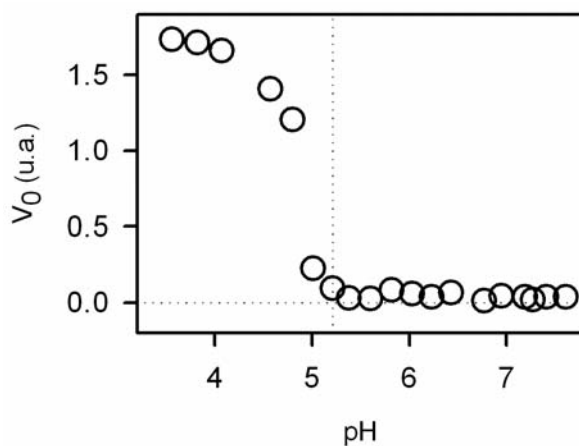


**Figure 58 : Cinétique de perméabilisation de LUVs anioniques par Tm.** *A* Cinétiques obtenues pour Tm en présence de LUVS anioniques (EPC/EPA, 9 :1) à pH 7, pH 6, pH 5 et pH 4 à un ratio molaire L/P 5000. L'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B est mesurée en fonction du temps. La normalisation des cinétiques aux différents pHs se fait grâce aux intensités de fluorescence de la sulforhodamine B mesurées avant ajout de protéine ( $F_0$ ) et après lyse des vésicules lipidiques par du Triton X100 ( $F_{\text{Triton}}$ ). *B* Représentation des mêmes cinétiques de perméabilisation après normalisation. La pente de la droite passant par les premiers points d'intensité de fluorescence mesurés après ajout de Tm, représente la vitesse initiale de perméabilisation des vésicules lipidiques ( $V_0$ ).

De façon à pouvoir comparer directement les cinétiques obtenues à différents pH, les signaux sont normalisés. Ainsi les résultats sont représentés comme suit :  $(F-F_0)/(F_{\text{Triton}}-F_0)$  en fonction du temps (Fig.58B). La valeur de ce ratio est directement

proportionnelle à la quantité de sulforhodamine B relarguée des vésicules lipidiques. A pH 7 et pH 6, l'ajout de Tm n'a pas d'effet significatif sur l'évolution de la fluorescence. A pH 5, par contre, la fluorescence augmente dès l'ajout de Tm. Cette augmentation est encore plus forte à pH 4 et semble aussi plus rapide. Il semble donc que la perméabilisation de LUVs anioniques par Tm soit dépendante du pH. De plus, il semble que celle-ci ne débute qu'entre pH 6 et pH 5.

Afin de mieux caractériser la dépendance en pH de la perméabilisation des vésicules lipidiques anioniques par Tm, ces mêmes expériences ont été réalisées sur une gamme de pH plus grande (pH 7,6-pH 3,6) et les vitesses initiales de perméabilisation ( $V_0$ ) ont été déterminées pour un grand nombre de conditions (Fig. 59). Immédiatement après ajout de la protéine dans le milieu réactionnel, l'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B évolue de façon quasi-linéaire. Le signal à ce moment de la cinétique peut donc être représenté par une droite dont la pente est la vitesse initiale de perméabilisation des vésicules lipidiques ( $V_0$ ). La vitesse initiale de perméabilisation des vésicules lipidiques est quasiment nulle entre pH 7,6 et pH 5,2. Elle commence à augmenter dès pH 5, atteint son optimum (1,65 u.a.) à pH 4 et n'augmente que très faiblement pour des pHs plus acides.



**Figure 59 :** Dépendance en pH de la vitesse initiale de perméabilisation de vésicules lipidiques anioniques par Tm. Les vésicules anioniques sont composées de EPC/EPA 9:1. Les expériences de perméabilisation sont réalisées à un ratio molaire L/P de 1000. La perméabilisation débute pour des valeurs de pH inférieures à pH 5,2. La concentration finale de Tm est 9 nM.

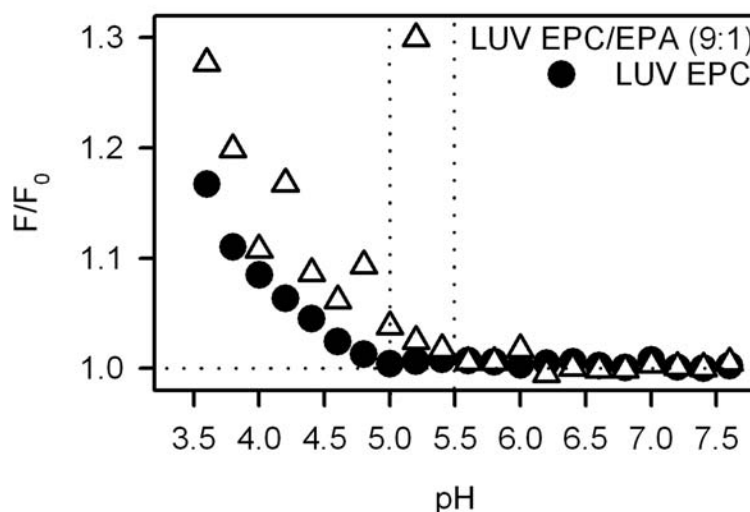
Le pH auquel débute la perméabilisation est en bonne corrélation avec celui pour lequel le FRET Trp/Dansyl commence à être significatif (Fig. 51). De plus, les expériences d'extinction de fluorescence du tryptophane par les lipides bromés (Fig. 53) ont montré que l'intensité de fluorescence des tryptophanes de Tm n'est affectée par la proximité des atomes de brome que lorsque le pH du milieu est inférieur ou égal à pH 5,5. L'interaction

de  $T_m$  avec des vésicules lipidiques anioniques est donc dépendante du pH, elle débute autour de pH 5,5.

D'après les expériences d'inhibition de la fluorescence des tryptophanes par les lipides bromés, il semble que les interactions électrostatiques entre  $T_m$  et la bicouche lipidique soient prépondérantes. Ces mêmes expériences de perméabilisation de vésicules lipidiques ont donc été réalisées en présence de LUVs globalement neutres afin de mettre en évidence le rôle de ces interactions dans la capacité de  $T_m$  à perméabiliser les membranes. Nous avons également réalisé des expériences de FRET Trp/Dansyl-DHPE pour  $T_m$  en présence de LUVs globalement neutres (EPC) afin de caractériser plus finement le rôle des interactions de type électrostatique dans la liaison de  $T_m$  à la bicouche lipidique.

- **Effet de la charge globale des vésicules lipidiques**

Les expériences de FRET Trp/Dansyl-DHPE pour  $T_m$  en présence de vésicules lipidiques globalement neutres (EPC/Dansyl-DHPE (10 :0,5)) ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA/Dansyl-DHPE (9 :1:0,5)) (Fig. 51). La Figure 60 montre la superposition des résultats obtenus. En présence de LUVs globalement neutres (Fig. 60●), le ratio  $F/F_0$  est égal à 1 sur une gamme de pH allant de pH 7,6 à pH 5. Ceci montre qu'il n'y a pas de FRET entre les Trps de  $T_m$  et les groupements Dansyl des têtes polaire des lipides phosphatidyléthanolamine. Le ratio  $F/F_0$  augmente pour des pHs plus acides et atteint 1,28 à pH 3,6, indiquant une proximité entre les tryptophanes de  $T_m$  et les groupements Dansyl.



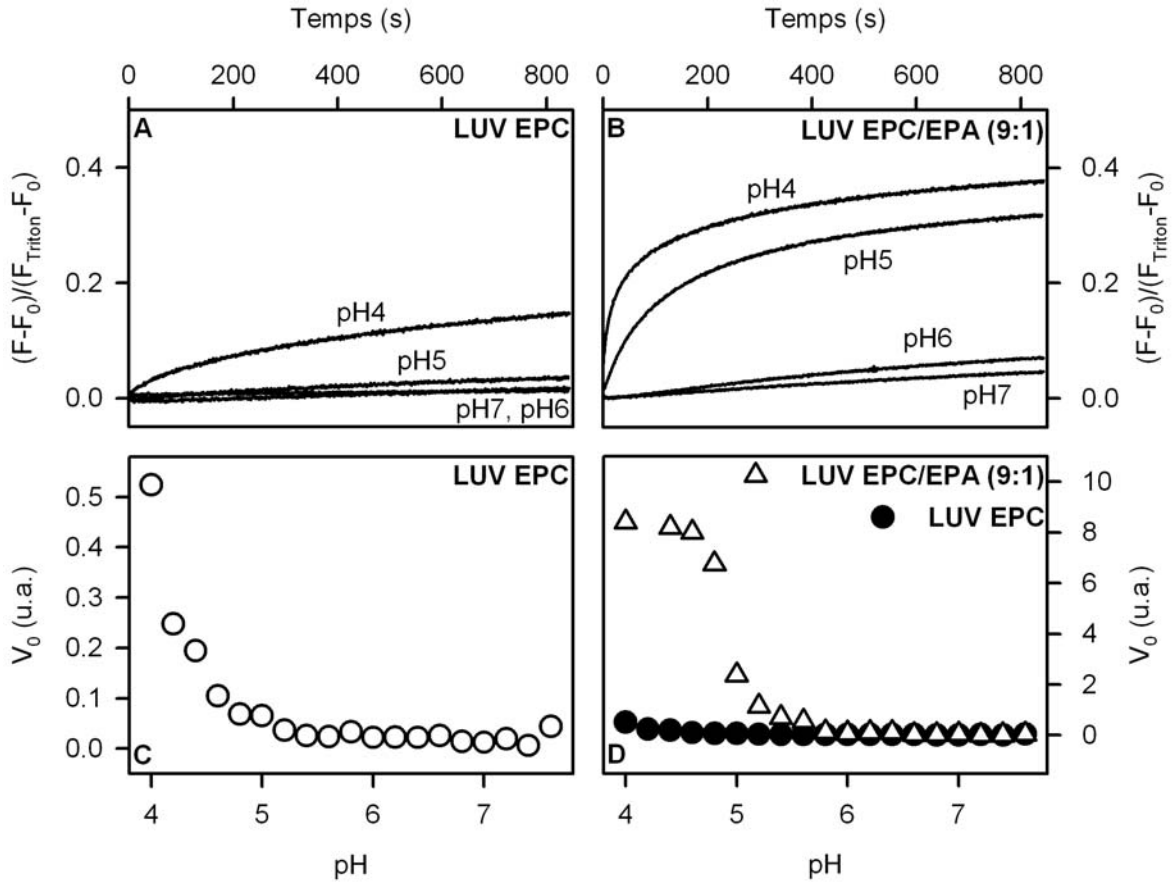
**Figure 60 :** Evolution du FRET Trp/Dansyl-DHPE en fonction du pH.  $T_m$  ( $0,1 \mu M$ ) est en présence de LUVs EPC/Dansyl-DHPE (10 :0,5) (●) et EPC/EPA/Dansyl-DHPE (9 :1 :0,5) ( $\Delta$ ) à un ratio molaire L/P 100.  $F/F_0$  est le ratio d'intensités de fluorescence du Dansyl-DHPE après ajout de protéine ( $F$ ) et avant ajout de la protéine ( $F_0$ ). Les intensités de fluorescence sont mesurées à 520 nm.

Tm interagit donc avec des LUVs globalement neutres. Cette interaction est dépendante du pH et le FRET est observé pour des pHs acides. Cependant le phénomène de FRET intervient à pH plus acide (pH 5) que lorsque Tm est en présence de LUVs anioniques (pH 5,5) (Fig. 60Δ). Les interactions électrostatiques entre Tm et la bicouche lipidique ne sont donc pas indispensables à l'interaction, mais permettent une interaction plus précoce, c'est à dire à pH moins acide.

Les expériences de perméabilisation de LUVs globalement neutres (EPC) par Tm ont été réalisées en parallèle de celles effectuées en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA 9 :1). Le ratio molaire L/P utilisé est de 5000 et les expériences sont réalisées sur une gamme de pH allant de pH 7,6 à pH 4. Les Figures 61A et 61B montrent les cinétiques obtenues à pH 7, pH 6, pH 5 et pH 4. L'évolution du rapport  $(F-F_0)/(F_{\text{Triton}}-F_0)$  est représenté en fonction du temps. Dans le cas des LUVs neutres (Fig. 61A), aucun relargage de sulforhodamine n'est observé entre pH 7 et pH 5. Tm ne perméabilise donc pas les LUVs globalement neutres dans ces conditions de pH. A pH 4, dès ajout de Tm le rapport la fluorescence de la sulforhodamine augmente indiquant qu'il y a perméabilisation des LUVs neutres par Tm à pH acide.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus en présence de LUVs anioniques (Fig. 61B), il ressort que le comportement de Tm en présence de LUVs neutres est différent. En effet, Tm est capable de perméabiliser les LUVs anioniques dès pH5 (Fig. 61B), alors que la protéine ne perméabilise les LUVs neutres qu'à pH 4. Afin de mieux caractériser la perméabilisation des LUVs globalement neutres par Tm, les vitesses initiales ( $V_0$ ) de perméabilisation ont été calculées sur une large gamme de pH (pH 7,6- pH 4) (Fig. 61C). La vitesse initiale de perméabilisation de LUVs neutres par Tm augmente pour des valeurs de pH inférieures à pH 5.  $V_0$  atteint son maximum à pH 4 (0,52 u.a.). En présence de vésicules lipidiques anioniques (Fig. 61D),  $V_0$  augmente dès pH 5,5 et semble atteindre un plateau aux alentours de pH 4, avec  $V_0 \sim 8$  u.a. Cette vitesse initiale de perméabilisation de LUVs anioniques par Tm est 15 fois plus élevée que celle calculée pour Tm en présence de LUVs neutres.





**Figure 61 : Expériences de perméabilisation de LUVs EPC et EPC/EPA (9 :1) en fonction du pH.** La concentration finale en Tm est de 9 nM et le ratio molaire L/P de 5000. Le temps 0 s correspond à l'ajout de la protéine dans le milieu. **A** et **B** Cinétiques obtenues pour Tm en présence de LUVS neutres et anioniques (EPC/EPA, 9 :1) respectivement, à pH 7, pH 6, pH 5 et pH 4. L'intensité de fluorescence (F) de la sulforhodamine B est mesurée en fonction du temps. La normalisation des cinétiques aux différents pHs se fait grâce aux intensités de fluorescence de la sulforhodamine B mesurées avant ajout de protéine ( $F_0$ ) et après lyse des vésicules lipidiques par du Triton X100 ( $F_{Triton}$ ). **C** et **D**. Dépendance en pH de la vitesse initiale de perméabilisation de LUVS EPC et EPC/EPA (9 :1). Les vitesses initiales sont calculées pour des expériences de perméabilisation de LUVs par Tm (9 nM) à un ratio L/P 5000 sur une gamme de pH allant de pH 7,6 à pH 4.

La perméabilisation de vésicules lipidiques par Tm est donc dépendante du pH et de la charge globale de ces vésicules. En effet, comme le montrent les résultats présentés dans la Figure 61, même si Tm est capable de perméabiliser des LUVs neutres, la vitesse initiale de perméabilisation est dans ce cas 15 fois plus faible que dans le cas des LUVs anioniques. De plus, la perméabilisation des LUVs neutres par Tm débute pour des valeurs de pH plus acide.

- **Dépendance en taille de l'interaction de Tm avec la bicouche lipidique**

Lors des premières expériences de perméabilisation de vésicules lipidiques anioniques nous avons constaté que Tm perméabilise plus efficacement les LUVs que les SUVs. Les SUVs sont de petites vésicules lipidiques (50 nm de diamètre dans notre cas), il en résulte une plus grande exposition des chaînes aliphatiques des acides gras au solvant. Cela a pour effet de faciliter l'interaction protéine-membrane et par conséquent la perméabilisation. Or ce n'est absolument pas le cas ici. D'autre part, la forme très particulière de Tm (105 Å de long) n'est pas sans rappeler celles de protéines dont l'interaction avec la membrane dépend de la courbure de cette dernière. Cela a été observé par exemple, pour les domaines BAR des protéines telles que l'amphyphisine II (Casal *et al.*, 2006). C'est pourquoi nous avons étudié un éventuel effet de la taille des vésicules sur l'interaction avec Tm ainsi que sur la perméabilisation.

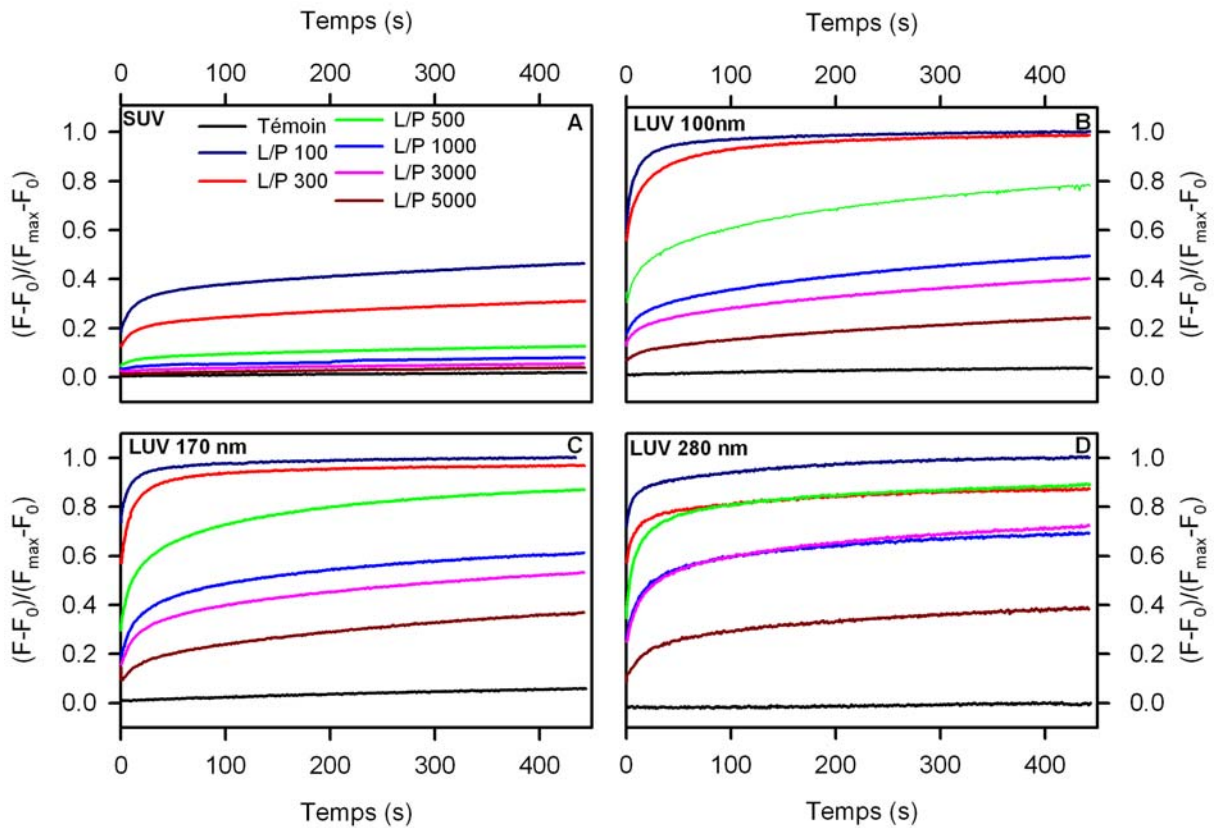
Ces expériences de perméabilisation de vésicules lipidiques ont été réalisées avec des vésicules lipidiques de différentes tailles : SUVs de 50 nm de diamètre, LUVs de 100 nm, 170 nm et 280 nm de diamètre. La taille des vésicules lipidiques est vérifiée par diffusion dynamique de la lumière (cf. « Matériel et Méthodes »).

Les expériences de perméabilisation réalisées en présence de LUVs anioniques (170 nm de diamètre) ont montré que la vitesse initiale de perméabilisation par Tm est maximale à pH 4 (Fig. 59). D'autre part, l'efficacité de perméabilisation de Tm sur des vésicules anioniques est plus grande que sur des vésicules globalement neutres (Fig. 61). Par conséquent, toutes les expériences présentées ci-dessous ont été réalisées à pH 4 en présence de vésicules lipidiques anioniques de différentes tailles.

### Effet du ratio molaire Lipide/Protéine (L/P)

Dans un premier temps, une titration en lipides est effectuée de façon à caractériser la perméabilisation des différents types de vésicules lipidiques anioniques à pH 4. Pour chaque type de vésicule, l'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B mesurée à 586 nm est suivie en fonction du temps après ajout de Tm, à différents ratios L/P. La normalisation effectuée dans ce cas, n'est pas la même que celle utilisée lors des expériences présentées dans le début de la partie C des résultats. La valeur  $F_0$  reste l'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B mesurée avant ajout de la protéine mais l'intensité de fluorescence maximale utilisée ( $F_{\max}$ ) n'est pas celle mesurée après ajout de

Triton X100 ( $F_{\text{Triton}}$ ) mais celle mesurée à 600 s de cinétique pour le ratio L/P 100 de chaque type de vésicules lipidiques. Ce ratio L/P a été choisi car dans ces conditions l'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B atteint rapidement un plateau dont l'intensité de fluorescence correspond au maximum obtenu sur la gamme de L/P testée ; l'efficacité de perméabilisation ( $(F-F_0)/(F_{\text{max}}-F_0)$ ) est alors de 1. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 62. Le temps 0 s est le temps de la cinétique auquel la protéine a été ajoutée dans le milieu.



**Figure 62 : Cinétique de perméabilisation de vésicules lipidiques anioniques (EPC/EPA, 9 :1) par Tm à pH 4.** Les cinétiques sont effectuées à différents ratios molaires Lipide/Protéine (L/P) pour Tm en présence de SUVs (A), LUVs de 100 nm (B); 170 nm (C) et 280 nm (D) de diamètre. La normalisation pour chaque type de vésicule lipidique est effectuée par rapport à l'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B mesurée à 600 s mesurée pour le ratio L/P 100. Pour les SUVs c'est l'intensité de fluorescence mesurée pour les LUVs 100 nm qui est utilisée pour la normalisation.

Cas particulier des SUVs en présence de Tm

Nous n'avons pu effectuer le même type de normalisation pour les expériences réalisées en présence de SUVs, car à L/P 100, l'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B continue d'augmenter même après 1200 s de cinétique. Nous avons donc choisi, dans ce cas précis d'utiliser l'intensité de fluorescence au plateau mesurée avec des LUVs de 100 nm de diamètre pour effectuer la normalisation. C'est pourquoi sur la Figure 62A, l'efficacité de perméabilisation obtenue à L/P 100 n'est pas de 1 mais d'environ 0,5 après 600 s de cinétique. Le taux de perméabilisation des SUVs anioniques varie très peu pour les ratios L/P compris entre 5000 et 500 pour lesquels elle est inférieure à 0,1 après 600 s. Elle ne varie significativement que lorsque le L/P est inférieur à 300. Enfin, à L/P 100, l'efficacité de perméabilisation continue de croître à 600 s de cinétique, ce qui n'est pas le cas pour les LUVs. Ceci indique que le relargage de la sulforhodamine B n'est pas complet à ce stade.

De plus, des expériences de diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont montré qu'à pH 4, la taille apparente des SUVs augmente avec le temps. La Figure 63 montre un exemple de l'évolution du diamètre apparent des SUVs en présence de Tm. Cela indique que les SUVs s'agrègent. Dans le cas des LUVs la taille n'évolue pas dans le temps après ajout de Tm. Le diamètre des différents types de vésicules lipidiques est indiqué dans le Tableau 3. La taille apparente des LUVs reste globalement la même en présence de Tm à pH 7 et à pH 4. Ces vésicules sont perméabilisées à pH acide, mais leur intégrité n'est donc pas altérée. Ainsi, il apparaît que le mode d'interaction de Tm avec les SUVs diffère de celui qui intervient en présence de LUVs. Pour cette raison, nous ne comparerons par la suite, que les résultats obtenus en présence de LUVs.

| Taille théorique | Diamètre mesuré  |                          |                          |
|------------------|------------------|--------------------------|--------------------------|
|                  | Vésicules seules | + Tm à pH7<br>(L/P 1000) | + Tm à pH4<br>(L/P 1000) |
| SUV              | 48,1 ± 2,7 nm    | 51,9 ± 2,3 nm            | Voir figure ci-dessous   |
| 100 nm           | 98,2 ± 4,9 nm    | 102,2 ± 6,3 nm           | 103,8 ± 5,7 nm           |
| 170 nm           | 174,2 ± 12,7 nm  | 170,2 ± 15,7 nm          | 177,8 ± 11,3 nm          |
| 280 nm           | 288,1 ± 23,1 nm  | 294,1 ± 20,7 nm          | 296,6 ± 25,1 nm          |

Tableau 3 : Taille des différents type de vésicules utilisées.

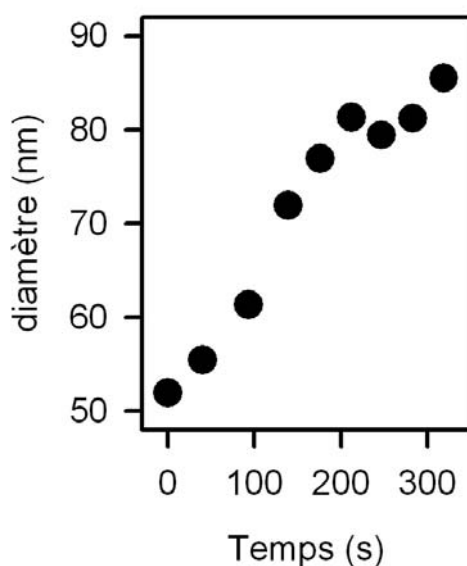


Figure 63 : Evolution du diamètre des SUVs en fonction du temps. Exemple de profil de variation du diamètre des SUVs en présence de Tm à pH 4 et à un ratio L/P 1000.

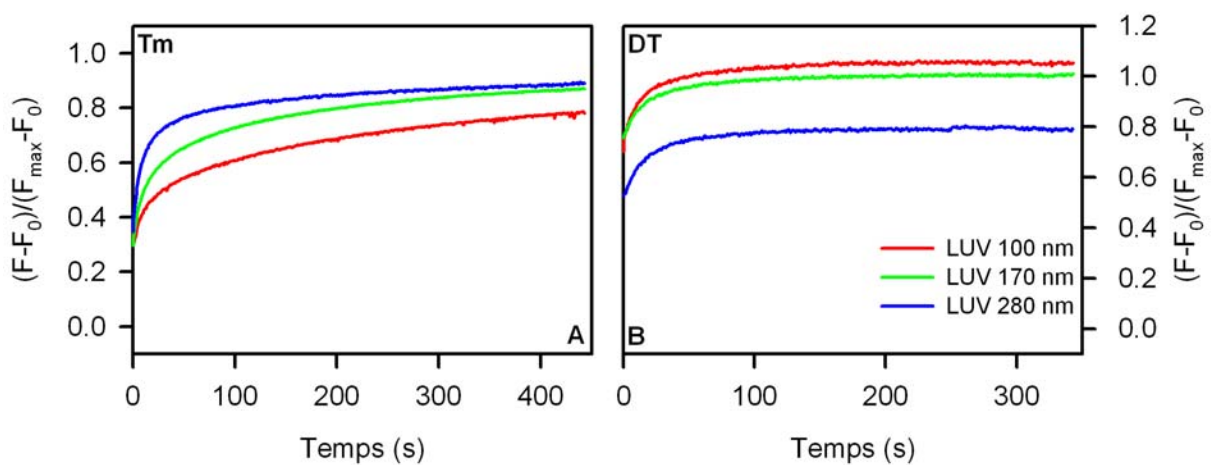
#### LUVs à différents ratios L/P

Le témoin, en noir sur la Figure 62, correspond à l'évolution de l'intensité de fluorescence de la sulforhodamine B pour les vésicules lipidiques anioniques seules en solution. Dans ce cas, le suivi du ratio  $(F-F_0)/(F_{\max}-F_0)$  rend compte de la « fuite » de la sulforhodamine B hors des vésicules lipidiques. Ce témoin permet de savoir si la perméabilisation observée en présence de Tm est significative. Dans ce cas, la comparaison des témoins respectifs avec les différentes conditions testées montre que Tm est capable de perméabiliser les LUVs quel que soit leur diamètre (100 nm, 170 nm et 280 nm) (Fig. 62B-D). L'efficacité de perméabilisation pour un même type de LUVs est effectivement dépendante du ratio L/P. Plus le ratio L/P est élevé plus le nombre de lipides par protéines est élevé. Par conséquent, le nombre de protéine par vésicule lipidique diminue avec l'augmentation du ratio L/P. Il en résulte que l'efficacité de perméabilisation diminue avec

l'augmentation du ratio L/P. La même expérience a été réalisée avec DT (résultats non montrés).

Comparaison des cinétiques obtenues à L/P 500

La Figure 64 représente les résultats obtenus au ratio L/P 500 pour Tm et DT. Le choix du ratio Lipide/Protéine est basé sur deux critères majeurs que sont la vitesse de la cinétique et le taux de sulforhodamine B libérée des vésicules lipidiques après 600 s de cinétique. Le ratio L/P 500 est un bon compromis entre ces deux critères, qui permet d'observer d'éventuelles différences entre les différentes conditions étudiées ici. D'autre part, Pour nous assurer que cet effet de la taille des vésicules lipidiques sur l'interaction avec Tm n'était pas dû à un biais provenant de l'expérience nous avons utilisé un témoin : le domaine de translocation de la toxine diphtérique (DT). Son mode d'interaction avec les membranes est caractérisé et la perméabilisation de vésicules lipidiques par DT n'est pas dépendante de la courbure des vésicules lipidiques (Chenal *et al.*, 2002 ) (Montagner *et al.*, 2007). Il est dépendant du pH. C'est un processus qui a lieu en deux étapes : dans un premier temps, entre pH 7 et pH 6, le domaine de translocation de la toxine diphtérique se lie aux membranes de façon superficielle, puis avec l'acidification du pH DT s'insère plus profondément dans la bicouche lipidique, ce qui va entraîner la perméabilisation des vésicules lipidiques.



*Figure 64 : Cinétique de perméabilisation de LUVs anioniques (EPC/EPA, 9 :1) par Tm et DT à un ratio L/P 500 à pH 4.*

Pour les cinétiques réalisées en présence de DT (Fig.64B), le ratio  $(F-F_0)/(F_{\max}-F_0)$  croît rapidement dans une première phase ; l'augmentation du ratio est de 0,2 en 50 s pour tous les types de LUVs utilisés. Puis dans une deuxième phase, l'évolution est plus lente, et un plateau est atteint après 150 s. Les cinétiques effectuées en présence de DT montrent un profil similaire pour tous les types de LUVs utilisés. En effet, quelle que soit la taille des LUVs avec lesquelles DT est mis en contact, l'évolution du ratio  $(F-F_0)/(F_{\max}-F_0)$  est similaire. La valeur du ratio  $(F-F_0)/(F_{\max}-F_0)$  calculée pour les LUVs de 280 nm de diamètre est de 0,8 au plateau contre 1,0 pour les deux autres types de LUVs utilisés. Cette différence est due à l'erreur induite par la normalisation, c'est pourquoi ce sont les dépendances en temps qui sont comparées et non la valeur des ratios  $(F-F_0)/(F_{\max}-F_0)$  à un temps donné.

Dans le cas de Tm (Fig. 64A), le ratio  $(F-F_0)/(F_{\max}-F_0)$  augmente encore après 400 s de cinétique pour les trois tailles de LUVs. La perméabilisation des LUVs par Tm est donc plus lente que celle de DT. D'autre part, l'observation de l'évolution du taux de perméabilisation des LUVs par Tm montre que les cinétiques sont plus lentes pour Tm en présence de LUVs de 100 nm de diamètre. Les cinétiques de perméabilisation de LUVs anioniques par Tm sont donc dépendantes de la taille des vésicules lipidiques.

Cette étude est effectuée à un ratio molaire L/P fixe pour Tm en présence de vésicules lipidiques de différentes tailles contenant donc des quantités différentes de lipides. La variation de la taille des LUVs utilisées implique la variation du nombre de protéines par vésicules lipidiques. Ainsi pour un ratio molaire L/P 500, dénombre-t-on 200 protéines pour une LUV de 110 nm, 600 pour une LUV de 170 nm et 1600 pour une LUV de 280 nm de diamètre. Par conséquent, il est possible que cette différence en nombre de protéines par vésicule lipidique soit la cause de cette dépendance en taille de vésicules lipidiques. Il est également possible que cela soit dû à une sensibilité particulière de Tm à la courbure des LUVs. Les longues paires d'hélices  $\alpha$  du domaine de translocation de la toxine botulique sont courbées, conférant ainsi une courbure à la protéine d'un rayon d'environ 70 nm. Cette forme particulière est retrouvée dans quelques protéines dont l'interaction avec la bicouche lipidique est sensible à la courbure de cette dernière (cf. « Introduction » B.VI.4). Dans ce cas, l'interaction protéine/membrane est plus forte lorsque la courbure de la bicouche lipidique est proche de celle de la protéine.

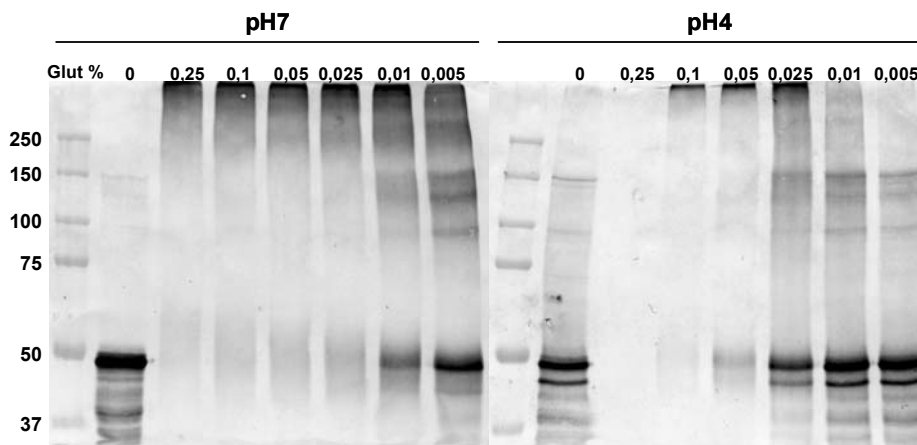
A ce stade de notre étude, nous ne pouvons déterminer si la dépendance en taille observée lors de la perméabilisation des LUVs anioniques par Tm est causée par la variation du nombre de protéines par vésicule lipidique entre les différentes conditions

testées ou si elle est le seul fait de la courbure des LUVs. Il est également possible que ce soit la résultante de ces deux paramètres.

#### **II.4 –RESULTATS PRELIMINAIRES : Expériences de pontage au glutaraldéhyde**

Plusieurs études ont montré que *in vitro*, le domaine de translocation de la toxine botulique forme un pore multimérique (Fischer & Montal, 2007a, 2007b), (Schmid *et al.*, 1993) dont les segments transmembranaires ont été définis par calcul de moment hydrophobe et prédiction de structure secondaire (Lebeda & Olson, 1994). La question s'est donc posée de savoir si la protéine recombinante Tm est capable de former des oligomères et le cas échéant si ces derniers se forment seulement dans des conditions propices à la liaison de Tm à la bicouche lipidique ou s'ils sont déjà présents en absence de membranes.

La première approche a consisté en l'utilisation du glutaraldéhyde comme agent pontant à différents pourcentages massiques à pH 7 et à pH 4 en présence de surfactant fluoré (0,15 mM) de façon à garantir la solubilité de Tm (Fig. 65).

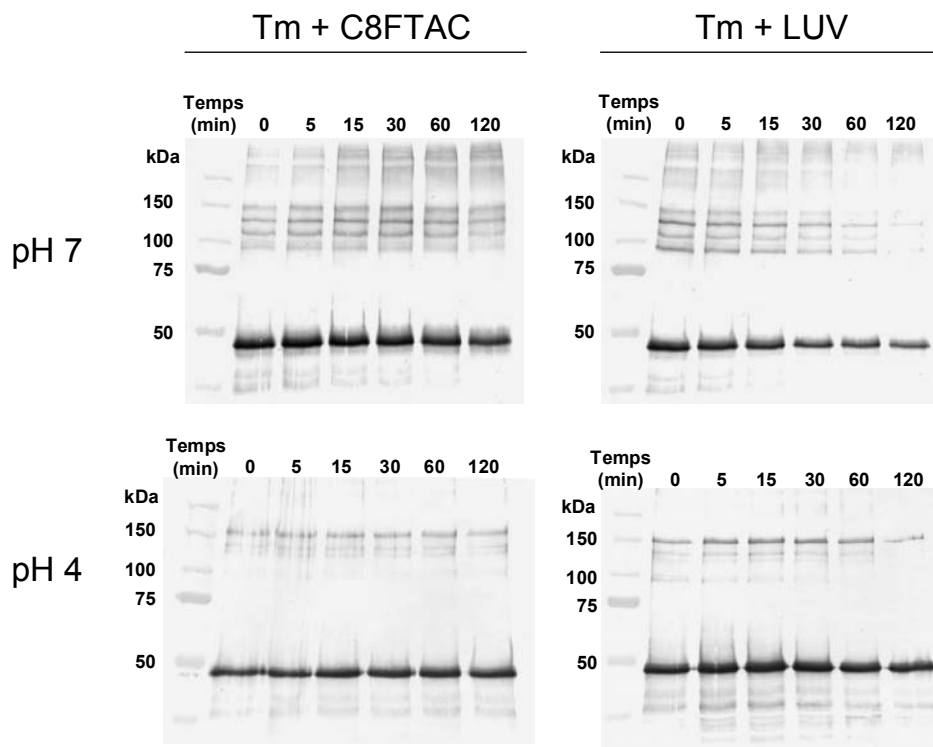


**Figure 65 : Expériences de pontage au glutaraldéhyde de Tm en présence de C8FTAC (0,15 mM) à pH 7 et pH 4. Les expériences sont réalisées à différents pourcentages de glutaraldéhyde (Glut%). La bande observée à 50kDa correspond au monomère de Tm.**

La bande majoritaire observée à 50 kDa en absence de glutaraldéhyde correspond au monomère de Tm. Les résultats obtenus montrent que à 0,005% et dans une moindre mesure à 0,01 % de glutaraldéhyde, le pontage induit principalement la formation d'oligomères d'environ 150 kDa à pH 7, ce qui correspond à un trimère de Tm. A pH 4, un oligomère correspondant à un trimère est également formé pour des pourcentages de glutaraldéhyde inférieurs à 0,025 %. Il semble donc que Tm s'oligomérisse à pH 7 et pH 4 en présence de C8FTAC. Nous avons ensuite choisi d'effectuer des cinétiques de réactions



de pontage à un pourcentage fixe de glutaraldéhyde à pH 7 et pH 4 en présence de C8FTAC ou de LUVs anioniques. Les pourcentages de glutaraldéhyde utilisés sont 0,01 % à pH 7 et 0,025 % à pH 4. Les résultats sont présentés dans la Figure 66.



*Figure 66 : Cinétiques de pontage au glutaraldéhyde de Tm en présence de C8FTAC (0,15 mM) et de LUVs anioniques (EPC/EPA 9 :1) à un ratio L/P 1000. Les échantillons prélevés à différents temps sont déposés sur un gel SDS-PAGE 8%. La détection de Tm se fait par immunodétection avec un anticorps anti-histidine. Les pourcentages de glutaraldéhyde sont de 0,01 % à pH 7 et 0,025 % à pH 4. La bande à 50 kDa correspond au monomère de Tm.*

Des oligomères de 100 kDa et de 150 kDa se forment à pH 7 pour Tm en présence de C8FTAC et de LUVs anioniques. Ces masses correspondent respectivement à des dimères et des trimères de Tm. Des bandes de masse intermédiaire apparaissent également. Leur masse moléculaire est comprise entre 100 et 150 kDa. Cela ne correspond à aucune forme oligomérique de Tm ; mais peut être causé par l'oligomérisation de formes tronquées de Tm. A pH 4, ce sont essentiellement des oligomères de 150 kDa qui sont formés en présence de C8FTAC et de LUVs. Ces expériences doivent être réalisées notamment dans des conditions pour lesquelles une dépendance en temps de la diminution du monomère de Tm (50 kDa) pourra être observée. Ces résultats semblent confirmer la formation d'oligomères de Tm à pH 7 et pH 4, lorsque la protéine recombinante est en présence de C8FTAC et de LUVS anioniques.



*DISCUSSION ET  
PERSPECTIVES*



**A DISCUSSION**

Les toxines bactériennes à activité intracellulaire dites toxines AB, parmi lesquelles la toxine diphtérique et la toxine botulique, ont en commun un schéma d'action (Montecucco *et al.*, 1994). Dans un premier temps, elles se lient à la membrane plasmique de leur cellule cible via un récepteur. Cette liaison provoque leur internalisation par endocytose. La toxine se trouve alors dans le compartiment endosomal dont l'acidification conduit à l'interaction du domaine de translocation avec la membrane de l'endosome. Cette interaction conduit soit à la déstabilisation de la membrane soit à la formation d'un pore transmembranaire. Le domaine catalytique passe alors dans le cytosol de la cellule cible pour y exercer son activité.

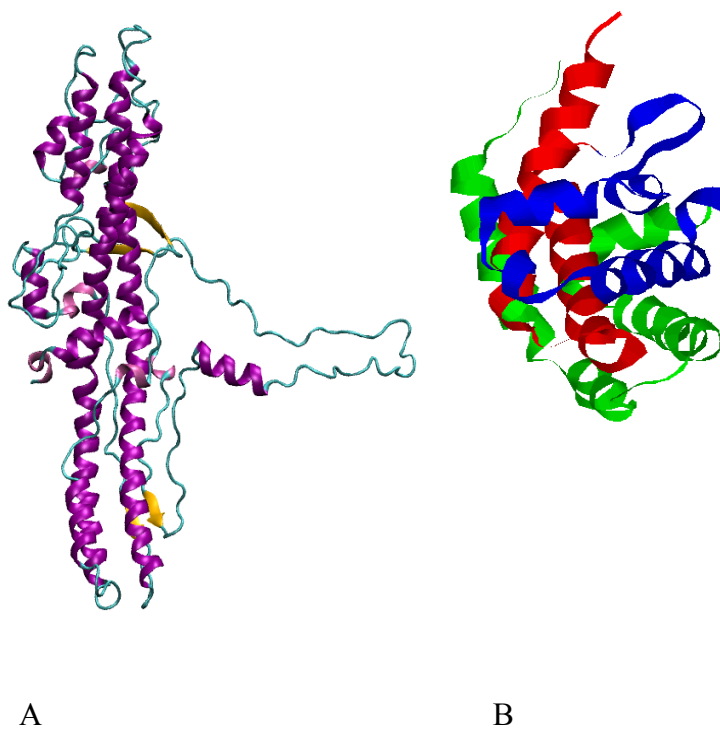
Cependant, malgré un mécanisme général commun, chaque toxine se lie spécifiquement à son récepteur à la membrane plasmique de la cellule cible. Ce récepteur peut être protéique, comme celui de la toxine diphtérique, l'HB-EGF (Heparin Binding-Epidermal Growth Factor) (Louie *et al.*, 1997) ou ce peut être un double récepteur comme celui de la toxine botulique : Syntaxine+ ganglioside. Enfin, il peut également s'agir d'un double récepteur protéique comme dans le cas de l'anthrax (ANTRX1 et ANTRX2) (Bradley *et al.*, 2001) (Scobie *et al.*, 2003), auquel se lie le pré-pore constitué d'un héptamère de l'antigène protecteur. Le pré-pore lie ensuite l'une ou l'autre ou bien les deux composantes enzymatiques de la toxine que sont le facteur léthal et le facteur oedématogène. La liaison spécifique à un récepteur particulier à la membrane plasmique donne aux toxines leur spécificité quant à la cellule cible.

Six activités enzymatiques différentes ont été répertoriées. Ainsi, le domaine catalytique de la toxine diphtérique catalyse l'ADP-ribosylation du facteur d'élongation eF2, ce qui a pour conséquence d'arrêter la synthèse protéique au sein de la cellule. Les toxines botuliques sont des endopeptidases à zinc dont l'activité consiste en le clivage spécifique d'une protéine SNARE inhibant ainsi la libération de neurotransmetteurs. La toxine pertussique conduit à l'ADP-ribosylation des protéines Gi.

L'internalisation de ces toxines implique leur passage dans les endosomes, dont l'acidification permet « l'activation » du domaine de translocation alors apte à transloquer le domaine catalytique dans le cytoplasme. Cette « activation » du domaine de translocation implique des changements structuraux qui peuvent être de différents types. Dans un cas, c'est le passage par un état partiellement replié qui permet l'interaction du domaine de translocation avec la membrane endosomale. L'autre alternative est

l'oligomérisation du fragment B de la toxine et l'insertion dans la membrane de l'oligomère conduisant à la formation d'un pore au travers duquel le domaine catalytique passe pour atteindre sa cible cytosolique. Ceci est observé pour l'anthrax et la toxine pertussique (Ménétrety *et al.*, 2005).

La toxine botulique appartient à la classe des toxines  $A_1B_1^{RT}$ , tout comme la toxine diphtérique et l'exotoxine A. Elle est structurée en trois domaines distincts de 50 kDa chacun : le domaine de liaison au récepteur, le domaine de translocation et le domaine catalytique. Son domaine de translocation comprend deux paires de longues hélices  $\alpha$  (105 Å) et une boucle enserrant le domaine catalytique (Fig.67A). Cette organisation des hélices  $\alpha$  est différente de celle observée généralement dans la classe  $A_1B_1^{RT}$ . En effet, les hélices sont le plus souvent organisées en paquets de forme globulaire, dans lesquels des hélices amphiphiles protègent le coeur hydrophobe du domaine de translocation, comme c'est le cas du domaine de translocation de la toxine diphtérique (Fig.67B).



**Figure 67 :** Représentation des domaines de translocation de la toxine botulique (A) et de la toxine diphtérique (B). A Les hélices  $\alpha$  sont représentées en violet, les feuillettes  $\beta$  en jaune et les parties non structurées en bleu clair. B Les hélices  $\alpha$  amphiphiles colorées en vert et bleu représentent respectivement les hélices  $\alpha$  TH1 à TH4 et TH5 à TH7. Les hélices  $\alpha$  hydrophobes TH8 et TH9 sont colorées en rouge.

La forme particulière du domaine de translocation de la toxine botulique laisse supposer que son interaction avec la bicouche lipidique pourrait suivre un mécanisme différent de celui intervenant pour la toxine diphtérique par exemple. Nous avons choisi de

travailler sur le domaine de translocation de la BoNT/A sous forme de protéine recombinante afin de caractériser le mode d'interaction du domaine de translocation de la toxine botulique avec la bicouche lipidique.

Dans un premier temps nous avons vérifié que la protéine recombinante (Tm) se repliait de façon autonome. La caractérisation structurale réalisée à pH 7 par dichroïsme circulaire a montré que Tm possède une structure secondaire en hélice  $\alpha$  et qu'elle a également une structure tertiaire (« Résultats » B.I.1). Cependant, cette protéine n'est pas soluble sur une large gamme de pH (pH 6-pH 3), recouvrant celle retrouvée dans le compartiment endosomal. Nous avons dû recourir à un surfactant fluoré (C8FTAC) pour améliorer la solubilité de Tm à pH acide. Aucun changement de structure n'a pu être détecté en fonction du pH. Le domaine de translocation de la toxine botulique conserve donc ses structures secondaire et tertiaire à pH acide contrairement à ce qui est observé pour d'autres domaines de translocation de toxines de la classe  $A_1B_1^{RT}$  tels que le domaine de translocation de la toxine diphtérique qui subit des changements conformationnels conduisant à un état partiellement replié à pH acide (Chenal *et al.*, 2002).

Dans un deuxième temps, la caractérisation de l'interaction de Tm avec les membranes a été effectuée. Pour ce faire, nous avons utilisé des modèles de bicouches lipidiques : les LUVs. Cette étude comprend classiquement des expériences de partition « physique » de la protéine suivies par centrifugation. Ces partitions sont basées sur une étape d'ultracentrifugation à la suite de laquelle la protéine en solution reste en suspension dans le surnageant alors que les LUVs ainsi que la protéine liée à la bicouche lipidique sont dans le culot. Ce type d'approche n'a pas été possible avec Tm. Ainsi, malgré de nombreux essais d'optimisation du protocole, la protéine est toujours retrouvée dans le culot après centrifugation lors des expériences de contrôle effectuées sur la protéine en présence de C8FTAC. Nous avons donc effectué des expériences de liaison à la membrane. Dans ce cas, on ne sépare pas physiquement la protéine en solution des protéines liées aux vésicules lipidiques, mais on observe la liaison protéine-membrane en utilisant la spectroscopie de fluorescence.

Ainsi, des expériences de FRET entre les Trp de Tm et le groupement Dansyl greffé sur la tête polaire d'un phospholipide à éthanolamine ont été réalisées. De telles expériences donnent une indication sur la proximité entre le donneur, ici la protéine et l'accepteur, le groupement dansyl. Les expériences réalisées en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA 9 :1) ont montré que l'interaction de Tm avec la bicouche lipidique

anionique est dépendante du pH et a lieu pour des valeurs de pH inférieures à pH 5,5. Cependant, dans ce type d'expérience, le donneur et l'accepteur ne doivent pas être trop éloignés pour que le phénomène de FRET puisse être observé ; lorsqu'ils sont distants de 150 Å, l'efficacité du FRET n'est plus que de 50 %. Il se peut donc que la protéine soit liée à la bicouche lipidique pour des pHs moins acides mais que la distance Trp/Dansyl soit trop grande pour qu'il y ait FRET.

Afin d'affiner la caractérisation de l'interaction/insertion de Tm avec des LUVs anioniques, nous avons réalisé des expériences d'extinction de fluorescence du tryptophane par des atomes de brome situés sur les chaînes aliphatiques des lipides (sur les Carbone 9 et 10). Ces expériences ont montré que l'extinction de fluorescence du Trp par les lipides bromés est également dépendante du pH. Elle apparaît pour des pHs inférieurs à pH 5,5, indiquant que Tm est alors situé au moins en partie, dans le cœur hydrophobe de la protéine. Ce résultat concorde avec ceux obtenus lors des expériences de FRET Trp/Dansyl-DHPE. D'autre part, l'ajout de 200 mM NaCl permettant de lever les interactions de type électrostatique a été effectué lors des expériences d'extinction de fluorescence du Trp par les lipides bromés. L'intensité de fluorescence du Trp est alors devenue similaire quel que soit le pH. Ce résultat indique que Tm n'est plus insérée dans la bicouche lipidique. Nous ne pouvons toutefois pas déterminer si la protéine est encore liée à la bicouche lipidique. En effet, l'extinction de fluorescence par le Brome dépend de la distance avec le tryptophane. La distance maximale pour qu'il y ait extinction de la fluorescence du Trp par le Brome est de 10 Å. Il se peut qu'après ajout de 200 mM NaCl la protéine soit encore liée à la membrane dans la zone des têtes polaires à une distance trop grande pour que le brome ait un effet sur l'intensité de fluorescence du Trp de Tm. Les interactions de type électrostatique sont donc prépondérantes pour l'insertion de Tm avec la bicouche lipidique.

L'interaction du domaine de translocation de la toxine botulique est donc dépendante du pH et intervient à pH acide, comme c'est le cas des autres toxines bactériennes de la même famille. Ces toxines transitent par le compartiment endosomal lors de leur internalisation dans la cellule hôte. L'évolution de l'endosome précoce vers l'endosome tardif implique une acidification du pH. La régulation de l'interaction du domaine de translocation par le pH est donc liée à un processus physiologique de la cellule, lequel permet à la toxine de délivrer son domaine catalytique dans le cytosol à un instant bien défini.



La structure de Tm en présence de LUVs anioniques a ensuite été étudiée par dichroïsme circulaire, pour des valeurs de pH comprises entre pH 7 et pH 4. Les spectres enregistrés dans l'UV lointain sont superposables à pH 7 et pH 6 et présentent des minima à 208 nm et 222 nm caractéristiques d'un repliement en hélice  $\alpha$ . Les spectres enregistrés à pH 5 et pH 4 sont légèrement différents avec un décalage de 2 nm du minimum à 208 nm. Ce décalage peut avoir été causé par une « rigidification » des hélices  $\alpha$  consécutive à une augmentation de la compaction de la protéine ou bien être un artefact dû à l'augmentation de la diffusion des LUVs à pH acide. Par conséquent, nous considérerons ces variations comme étant non significatives. Les spectres enregistrés dans l'UV proche montrent que Tm conserve une structure tertiaire en présence de LUVs anioniques même à pH acide. D'après les expériences de dichroïsme circulaire, Tm ne subit donc aucun changement conformationnel important lors de son interaction avec la bicouche lipidique anionique. Cependant les expériences de fluorescence intrinsèque du tryptophane montrent que le ratio  $IF_{360\text{nm}}/IF_{320\text{nm}}$  diminue avec l'acidification du pH lorsque Tm est en présence de LUVs anioniques. La diminution de ce ratio indique que l'environnement des Trps devient apolaire lors de l'acidification du pH. Ce changement d'environnement peut avoir trois causes possibles. Dans un premier cas, la compaction de Tm augmente lors de l'acidification du pH, dans un deuxième cas, ce sont des changements de structure quaternaire qui entrent en jeu et dans un troisième cas, c'est l'interaction de Tm avec la bicouche lipidique qui explique le changement d'environnement des tryptophanes. A ce stade, nous ne pouvons pas déterminer quelle est la cause de ce changement d'environnement des Trps de Tm en présence de membrane. Cette détermination est d'autant plus complexe que la même variation du ratio  $IF_{360\text{nm}}/IF_{320\text{nm}}$  est également observée lorsque Tm est en présence de C8FTAC. Toutefois, les expériences d'extinction de fluorescence du tryptophane par le Brome ont montré que Tm s'insère dans la bicouche lipidique à pH acide (pH 5,5). Il semble donc que la diminution du ratio  $IF_{360\text{nm}}/IF_{320\text{nm}}$  lors de l'acidification du pH, lorsque Tm est en présence de LUVs anioniques soit causée au moins en partie par l'insertion de la protéine dans la bicouche lipidique.

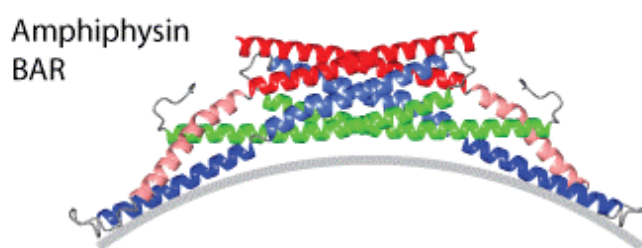
L'état fonctionnel des domaines de translocation des toxines bactériennes à activité intracellulaire est caractérisé par leur aptitude à perméabiliser la bicouche lipidique. Cette interaction permet le passage du domaine catalytique dans le cytosol pour y exercer son activité. Ainsi le domaine de translocation de la toxine diphtérique déstabilise au moins la membrane de l'endosome ou forme un pore pour le passage du domaine catalytique. Dans le cas de l'anthrax c'est un pore composé d'un heptamère du fragment B qui se forme.

Dans tous les cas, l'apparition de la forme fonctionnelle induit une perméabilisation des membranes, par déstabilisation de la bicouche lipidique ou formation d'un pore de taille définie. Un moyen d'étudier l'apparition de la forme fonctionnelle du domaine de translocation de la toxine botulique est donc d'effectuer des expériences de perméabilisation de vésicules lipidiques. Ces dernières ont montré que Tm est capable de perméabiliser des LUVs anioniques à pH acide dès pH 5,5. La vitesse de perméabilisation des LUVs anioniques est optimale aux alentours de pH 4. Ainsi, la forme fonctionnelle du domaine de translocation de la toxine botulique apparaît dès pH 5,5. Cette valeur de pH est corrélée avec celle observée lors des expériences de liaison à la membrane de Tm. D'autre part, les expériences réalisées en présence de LUVs globalement neutres ont montré que la perméabilisation débute à pH plus acide et que la vitesse optimale de perméabilisation dans ce cas est ~15 fois moindre qu'en présence de LUVs anioniques. Cela indique que les interactions de type électrostatique jouent un rôle majeur dans la perméabilisation des vésicules lipidiques par Tm. Ce résultat est en bonne corrélation avec les expériences d'extinction de fluorescence et de FRET pour lesquelles l'interaction de Tm avec la membrane se fait à pH plus acide lorsque la bicouche lipidique est globalement neutre.

La forme active de Tm apparaît donc à pH acide. L'apparition de cette forme active semble concomitante avec la liaison de Tm avec la membrane, comme le montrent les expériences de FRET et d'extinction de fluorescence du tryptophane par les lipides bromés. Aucun changement structural détectable par dichroïsme circulaire n'est associé à l'acidification du pH et à l'interaction de Tm avec la bicouche lipidique. Cette conservation de la structure est assez inédite pour les toxines  $A_1B_1^{RT}$ , parmi lesquelles on trouve la toxine diphtérique. Le comportement de Tm en présence de membranes semble plus proche de celui observé pour les toxines de type  $A_1B_5$  ou  $A_3B_7$  dont fait partie l'anthrax. Pour ces dernières, la perméabilisation de la bicouche lipidique est causée par la formation d'un pore nécessitant l'oligomérisation du fragment B de la toxine. Cette hypothèse serait en bonne corrélation avec les résultats des expériences de dichroïsme circulaire et de fluorescence intrinsèque du Trp. Ces expériences ont montré que Tm conserve ses structures secondaire et tertiaire même à pH acide. De plus, l'environnement des Trps de Tm devient plus apolaire lors de l'acidification du pH même en l'absence de membranes.

La structure particulière de Tm présente également des similarités avec des protéines dont l'interaction avec la bicouche lipidique est sensible à la courbure telles que les domaines BAR de l'amphiphysine II par exemple (Peter *et al.*, 2004). Ces dernières

sont constituées de longues hélices  $\alpha$  coudées conférant une courbure intrinsèque à la protéine selon son grand axe (« Introduction » B.VI.4) (Fig. 68). Cette courbure est d'autant plus prononcée lors de leur dimérisation. L'interaction des dimères de domaines BAR avec la bicouche lipidique est sensible à la courbure de cette dernière. En effet, une courbure de membrane adaptée à celle de la protéine va favoriser un plus grand nombre d'interactions entre les domaines BAR et la bicouche lipidique ; l'interaction est alors plus forte qu'en présence d'une bicouche plane par exemple. Cette interaction induit également des déformations de la bicouche lipidique. Ainsi les domaines BAR des amphiphysines et des endophilines conduit à la formation de tubes lors de leur interaction avec les membranes (Farsad *et al.*, 2001), (Richnau *et al.*, 2004).

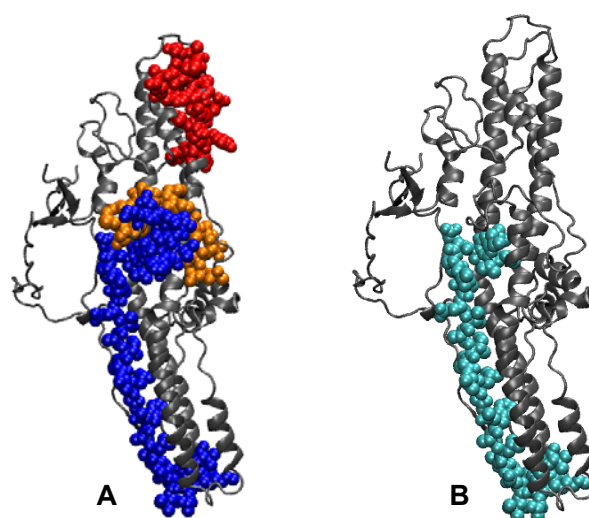


**Figure 68 :** *Représentation d'un dimère de domaines BAR d'amphiphysine. La courbure intrinsèque de la protéine est représentée en gris. Tiré du site internet [http://www.endocytosis.org/F-BAR\\_proteins/BAR-Superfamily.html](http://www.endocytosis.org/F-BAR_proteins/BAR-Superfamily.html). Chaque monomère est composé de trois hélices  $\alpha$  (une verte, une rouge et une bleue). Les couleurs plus soutenues indiquent les zones du dimère dont la charge est globalement positive.*

Afin de vérifier si Tm est également sensible à la courbure de la bicouche lipidique, nous avons réalisé des expériences de perméabilisation de LUVs de différentes tailles par Tm. Ces LUVs ont un diamètre moyen de 100 nm, 170 nm et 280 nm. Ces expériences ont montré que la perméabilisation par Tm à pH 4 de vésicules lipidiques anioniques est dépendante de leur taille. Cette sensibilité à la taille des LUVs peut être due à la courbure intrinsèque de la protéine dont l'interaction avec les membranes ne serait optimale qu'avec des membranes dont la courbure correspond à celle de Tm. Dans cette hypothèse, la sensibilité à la courbure de la membrane permettrait outre le pH, de réguler l'interaction de Tm avec la membrane. En effet, la toxine botulique est internalisée au niveau de la jonction neuromusculaire vraisemblablement au niveau de vésicules synaptiques après qu'elles aient libéré leur contenu. Une des voies possibles du recyclage des vésicules synaptiques implique le passage par les endosomes. Les tailles de ces différentes vésicules lipidiques sont différentes. Une vésicule synaptique a un diamètre moyen de 50 nm, alors que les endosomes au cours de leur évolution, changent de taille et de forme. Ainsi, lorsque

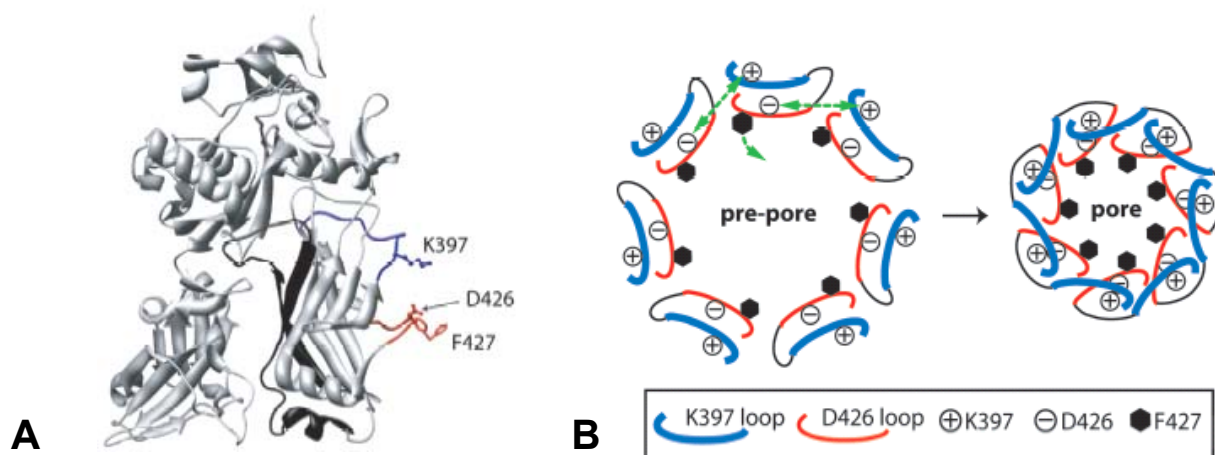
la toxine botulique se trouve dans la vésicule synaptique, son interaction avec la membrane est inhibée par la courbure de ce type de vésicules. Ce ne serait que lorsque la toxine se trouverait dans le compartiment endosomal, que toutes les conditions nécessaires à l'interaction du domaine de translocation avec la membrane seraient réunies -pH acide et courbure optimale- pour la perméabilisation. La seconde possibilité pouvant expliquer la dépendance en taille de l'interaction réside en l'oligomérisation de Tm. En effet, les expériences de perméabilisation de vésicules lipidiques de différentes tailles ont été effectuées à un seul ratio L/P. Dans ces conditions le nombre de protéines par vésicule lipidique varie. Ainsi à L/P 500, on compte 200 Tm pour un LUV 100 nm, 600 Tm pour une LUV 170 nm et 1600 Tm, pour une LUV 280 nm. Dans le cas où l'oligomérisation de Tm serait un préalable à son interaction avec la bicouche lipidique, il est probable que le nombre de protéines disponibles pour interagir avec les LUVs de différentes tailles soit un facteur limitant de la perméabilisation. Enfin il se peut également que ces deux facteurs influencent de façon concomitante la perméabilisation de la bicouche lipidique par Tm.

De récents résultats obtenus par le groupe Mauricio Montal (Fischer & Montal, 2007a, 2007b) suggèrent que le domaine de translocation de la toxine botulique forme un pore à travers la membrane plasmique. Le domaine catalytique passerait à travers ce pore sous une forme partiellement repliée et son repliement serait assisté après passage de l'autre côté de la bicouche lipidique par la partie du domaine de translocation dépassant de la membrane (Korazova & Montal, 2003). Des études menées *in vitro* ont montré que le canal formé par le domaine de translocation de la toxine botulique est un tétramère (Schmid *et al.*, 1993). Les segments transmembranaires impliqués dans la formation du pore ont été prédits par calcul de moment hydrophobe et prédiction de structure secondaire (595-614, 627-645, 648-691) (Fig. 3A) (Lebeda & Olson, 1994).



*Figure 69 : Représentation des régions potentiellement transmembranaires du domaine de translocation de la toxine botulique. A Les séquences prédites par Lebeda & Olson : en bleu : segment 648-591, en orange : segment 627-645, en rouge : segment 595-614. B. Localisation du peptide étudié par Oblatt-Montal et collègues (659-691).*

Plus particulièrement le peptide correspondant à la région 659-691 (Fig. 3B) a été étudié expérimentalement (Oblatt-Montal *et al.*, 1995) (Fig. 9 « Introduction » A.VI.2). Ce peptide est capable de s'insérer dans la bicouche lipidique. Cette région du domaine de translocation n'est pas structurée et pourrait être impliquée dans la formation des pores en jouant un rôle dans l'oligomérisation des domaines de translocation. L'implication de régions non structurées dans la formation de pores multimériques a été observée notamment pour l'anthrax. Dans ce cas, l'interaction de boucles entre monomères adjacents permet la formation du pore actif (Fig. 70). Sur la base des ces études il semble donc raisonnable de supposer que la dépendance en taille de perméabilisation par Tm serait plutôt due à l'oligomérisation de Tm.



**Figure 70 : Formation du pore dans le cas de l'anthrax.** A. Représentation d'un monomère d'antigène protecteur. Les boucles dites K397 et D426 sont représentées en bleu et rouge respectivement. B Schémas du pré-pore et du pore actif formé par un heptamère de l'antigène protecteur. L'interaction de la boucle K397 d'un monomère avec la boucle D426 d'un autre monomère permet la formation du pore actif. D'après Melnyk & Collier, 2006.

Des expériences de pontage au glutaraldéhyde de Tm sont en cours au laboratoire afin de mettre en évidence cette oligomérisation. Les premiers résultats sont présentés dans les Figures 65 et 66. Ils semblent indiquer que la protéine recombinante forme des oligomères à pH 7 et pH 4 en présence de C8FTAC ainsi que lorsqu'elle est en présence de LUVs anioniques. Il semble que ces oligomères sont des trimères, mais cela reste à confirmer, notamment en renouvelant ces expériences de pontage au glutaraldéhyde mais également en utilisant de nouveaux agents pontants et en utilisant la technique de chromatographie d'exclusion.

Ainsi, la dépendance en taille observée lors des expériences de perméabilisation serait due, au moins en partie à l'oligomérisation de la protéine. Cependant, dans ces expériences il semble que la formation d'un trimère de Tm soit prépondérante, ceci semble en désaccord avec ce qui a été observé par microscopie électronique pour la toxine entière (Schmid *et al.*, 1993). Cela pourrait être dû au fait nous travaillons avec une partie de la toxine et non avec la toxine entière.

**B PERSPECTIVES**

Les premiers résultats montrent que Tm est capable de former des oligomères de taille définie (150 kDa) qui correspondent à des trimères (Fig. 65 et Fig. 66). Ces résultats doivent cependant être encore confirmés. De plus ils sont en désaccord avec les études précédentes dans lesquelles il a été proposé que la toxine botulique forme un pore transmembranaire composé de quatre neurotoxines.

Aucun changement de structure de Tm n'a pu être mis en évidence par dichroïsme circulaire et fluorescence. Il est toutefois possible que des changements conformationnels surviennent, qui ne puissent être détectés par ces techniques spectroscopiques. Ce serait le cas de changements dans la structure quaternaire par exemple. Des expériences de protéolyse ménagée analysées par spectrométrie de masse sont actuellement en cours au laboratoire. Elles sont réalisées à pH 7 et pH 4 pour Tm en présence de C8FTAC et en présence de LUVs anioniques. Elles ont pour but de détecter des différences dans les profils de digestion enzymatique qui pourraient être dues à des changements conformationnels. L'analyse des différents profils obtenus sera effectuée par spectrométrie de masse. La cartographie de Tm a déjà été effectuée au sein du laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines de l'IBS dirigé par Eric Forest.

Afin de mieux localiser les zones impliquées dans la liaison de Tm à la bicouche lipidique, l'étude de mutants a débuté. Les mutations portent sur les Trps de Tm. En effet, si les signaux de fluorescence sont différents lorsqu'un Trp est muté, cela signifie que ce dernier est situé dans une zone impliquée dans l'interaction avec la bicouche lipidique. Des expériences d'échange Hydrogène/Deutérium analysées par spectrométrie de masse sont également prévues dans ce but. Le principe de ces expériences est décrit dans la partie « Apomyoglobine ». Elles permettent de localiser les zones d'une protéine en interaction avec la bicouche lipidique ainsi que son état conformationnel.

Il a été montré récemment que la boucle du domaine de translocation enserrant le domaine catalytique, outre son rôle d'inhibiteur de l'action enzymatique pourrait jouer un rôle dans la translocation (Brunger *et al.*, 2007). Nous prévoyons également d'étudier le rôle de cette boucle grâce à l'utilisation d'autres formes du domaine de translocation, notamment la protéine Ts qui ne contient pas cette boucle. La capacité de Ts à se lier à la bicouche lipidique et à la perméabiliser sera étudiée. La comparaison des résultats avec ceux obtenus avec Tm permettra de conclure quant à l'implication de la boucle dans la fonction du domaine de translocation de la toxine botulique. Dans ce même but, il est

également prévu d'étudier le mode d'interaction avec la bicouche lipidique de la protéine recombinante contenant les domaines catalytique et de translocation de la BoNT/A.

Nous envisageons également de cristalliser le domaine de translocation dans sa forme T<sub>m</sub>, afin de déterminer précisément sa structure lors de son insertion dans la bicouche lipidique. Dans ce cadre nous nous intéresserons plus particulièrement à la détermination de la zone de T<sub>m</sub> insérée dans la bicouche lipidique. Une collaboration a débuté avec le Laboratoire de Protéines Membranaires dirigé par Eva Pebay-Peyroula de l'IBS à Grenoble.





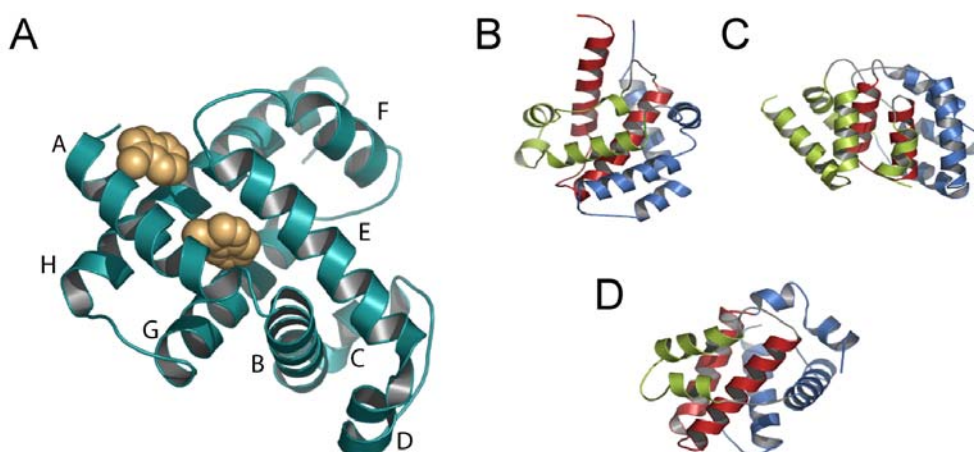


*MECANISME  
D'INTERACTION DE  
L'APOMYOGLOBINE AVEC  
LES MEMBRANES*



**A - INTRODUCTION**

L'apomyoglobine (aMb) est une protéine de 153 acides aminés contenant 8 hélices  $\alpha$  nommées de A à H. (Fig. 71A) (Griko *et al.*, 1988). C'est le membre le plus étudié de la famille des protéines à repliement de type globine. Ce repliement est caractérisé par la présence de 6 à 10 hélices  $\alpha$  (Holm & Sander, 1993 a et b). Certaines protéines qui sont amenées à interagir avec les membranes pour leur fonction font partie de cette famille. C'est le cas notamment de certains domaines de toxines bactériennes tels que le domaine de translocation de la toxine diphtérique (Fig. 71B) (Choe *et al.*, 1992, Bennet *et al.*, 1994), le domaine de formation du pore de la colicine E1. D Bcl-2. Le cœur hydrophobe de la protéine représenté en rouge (Fig. 71B-D) est littéralement pris en « sandwich » entre deux « couches » d'hélices  $\alpha$  amphiphiles colorées en vert et bleu



**Figure 71 : Exemples de protéines dont le repliement est de type globine : A Apomyoglobine. B. Domaine de translocation de la toxine diphtérique. C. Domaine de formation du pore de la colicine E1. D Bcl-2. Le cœur hydrophobe de la protéine représenté en rouge (Fig. 71B-D) est littéralement pris en « sandwich » entre deux « couches » d'hélices  $\alpha$  amphiphiles colorées en vert et bleu**

La réaction de repliement de l'aMb est bien caractérisée (Griko *et al.*, 1988), (Hughson *et al.*, 1990), (Barrick & Baldwin 1993), (Kataoka *et al.* 1995), (Gulotta *et al.*, 2003), (Jamin, 2005). Un intermédiaire partiellement replié est détecté lors de la réaction de dénaturation de l'aMb induite par le pH. La protéine conserve ses structures secondaires et tertiaires à pH 6 mais est complètement dénaturée à pH 2. L'état partiellement replié est stabilisé à pH 4, il a conservé ses structures secondaires, mais n'a plus de structure tertiaire stable. Ce sont les caractéristiques d'un état dit « molten-globule » (Hughson *et al.*, 1990).

Dans cet état les hélices A, G et H sont celles dont la stabilité est la plus grande (Eliezer *et al.*, 1998).

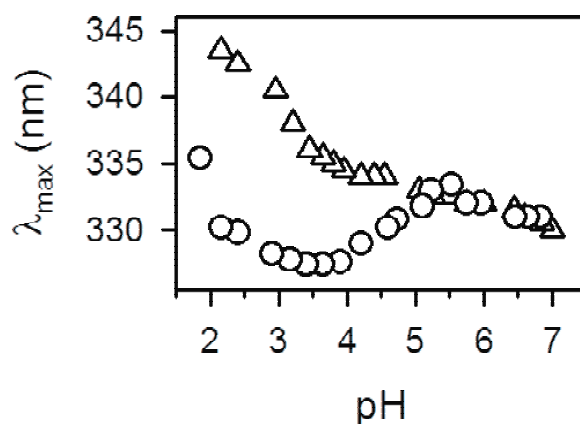
La formation d'un état « molten-globule » est un phénomène crucial dans l'interaction avec les membranes des protéines de la famille globine. En effet, la stabilisation de cet état partiellement replié induit l'exposition au solvant des zones hydrophobes des protéines ce qui a pour effet de diminuer les coût énergétique nécessaire aux changements conformationnels requis pour l'interaction avec les membranes (Chenal *et al.*, 2002), (van der Goot *et al.*, 1991).

Le but de ce travail est de caractériser le mode d'interaction de l'apomyoglobine avec les membranes

## B - RESULTATS

### I - Effet du pH

L'aMb possède deux tryptophanes situés sur l'hélice A (Fig. 71A). La longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence du tryptophane ( $\lambda_{\max}$ ) est sensible à son environnement. Cette propriété a été utilisée pour suivre les changements conformationnels de l'aMb en fonction du pH, ainsi que la liaison de l'aMb aux LUVs. La Figure 72 montre la dépendance en pH du  $\lambda_{\max}$  pour la protéine en solution ( $\Delta$ ) et en présence de LUVs anioniques ( $\circ$ ).



**Figure 72 : Evolution du  $\lambda_{\max}$  de l'aMb en fonction du pH.** Pour l'aMb (1  $\mu$ M) en solution ( $\Delta$ ) et en présence de LUVs anioniques ( $\circ$ ) EPC/EPA (9 :1) (300  $\mu$ M). Les expériences sont réalisées en présence 30 mM NaCl.

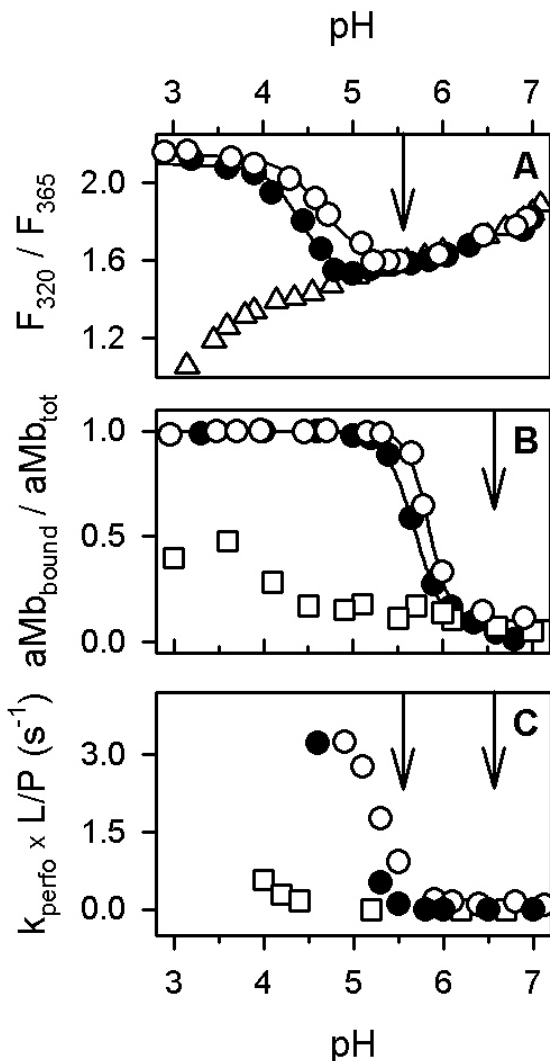
A pH 7, la protéine en solution (Fig. 72Δ) est dans sa conformation native, la valeur de son  $\lambda_{\max}$  est située aux alentours de 330 nm. Cela indique que les Trps situés dans l'hélice A sont dans un environnement relativement hydrophobe. Avec l'acidification du pH, la valeur du  $\lambda_{\max}$  augmente. Une première transition est observée entre pH 7 et pH 4. Le  $\lambda_{\max}$  atteint une valeur de 334 nm à pH 4 indiquant que les Trps sont légèrement plus exposés au solvant. L'état de l'aMb en solution à pH 4 est très bien caractérisé (Griko *et al.*, 1988), (Hughson *et al.*, 1990), (Barrick et Baldwin 1993), (Kataoka *et al.* 1995), (Gulotta *et al.*, 2003), (Eliezer *et al.*, 1998), (Kay et Baldwin, 1998). Dans ces conditions de pH, l'aMb a perdu sa structure tertiaire mais conserve ses structures secondaires. Une deuxième transition est observée entre pH 4 et pH 2, pendant laquelle, le  $\lambda_{\max}$  augmente pour atteindre une valeur proche de 344 nm : les Trps de l'aMb sont alors très exposés au solvant. Cette deuxième transition est à corrélérer avec la stabilisation de l'état complètement dépliée de la protéine à pH acide (Griko *et al.*, 1988).

Les expériences en présence de LUVs anioniques (Fig. 72○) sont réalisées à un ratio molaire (Lipide/Protéine) L/P 300. L'évolution du  $\lambda_{\max}$  est comparable à celle de la protéine en solution entre pH 7 et pH 5,5. En dessous de pH 5, la diminution du  $\lambda_{\max}$  indique que les Trps pénètrent dans un environnement plus hydrophobe. La valeur minimale du  $\lambda_{\max}$  est atteinte à pH 3,7 (327 nm). Pour des pHs plus acides, le  $\lambda_{\max}$  augmente à nouveau indiquant que l'environnement des Trps redevient polaire. Cela est sans doute causé par la levée des interactions de l'aMb avec la bicouche lipidique. Cette inhibition de l'interaction à pH acide est liée à la protonation des têtes polaires EPA (pKa=2,9) qui a pour effet de changer la charge de la membrane qui devient alors globalement neutre dans ces conditions.

## **II - Caractérisation de l'interaction de l'aMb avec les membranes**

Des expériences de suivi du ratio des intensités de fluorescence à 365 et 320 nm ( $F_{320}/F_{365}$ ) ont été effectuées en plus de celles de fluorescence intrinsèque du tryptophane. L'utilisation de ce ratio permet d'observer des changements plus fins dans l'environnement des Trps d'une protéine. La Figure 73A montre les expériences réalisées pour l'aMb en solution (Fig. 73AΔ), en présence de LUVs anioniques à faible force ionique (30 mM NaCl) (Fig. 73A○) et en présence de LUVs anioniques à forte force ionique (150 mM NaCl) (Fig. 73A●), en fonction du pH. Les expériences représentées dans la Figure 73A○ et

$\Delta$  sont réalisées dans les mêmes conditions que les expériences de fluorescence intrinsèque représentées dans la Figure 72. La comparaison de ces deux types d'expériences montre que le  $\lambda_{\max}$  et le ratio  $F_{320}/F_{365}$  présentent une dépendance en pH similaire. En présence de LUVs anioniques et 30 mM NaCl (Fig. 73A○), le ratio  $F_{320}/F_{365}$  augmente entre pH 5,2 et pH 3,5, indiquant que l'aMb interagit avec les LUVs anioniques dans ces conditions. La contribution des interactions de type électrostatique dans la liaison de l'aMb aux LUVs a été étudiée en faisant varier la force ionique. En effet, lorsque la concentration de NaCl est plus grande, les charges présentes sont écrantées inhibant ainsi les interactions électrostatiques. La Figure 73A● montre les résultats obtenus pour l'aMb en présence de LUVs anioniques et 150 mM NaCl. Dans ces conditions de force ionique, le ratio  $F_{320}/F_{365}$  augmente à partir de pH 4,8 contre pH 5,2 en présence de 30 mM NaCl. La pénétration des Trps dans un environnement plus hydrophobe débute donc à pH plus acide lorsque les interactions électrostatiques sont levées. Elle a lieu entre pH 4,8 et pH 3 contre pH 5,2 et pH 3 à faible force ionique.



**Figure 73 : Effet de la charge et de la force ionique sur la liaison de l'aMb aux LUVs en fonction du pH.** Toutes les expériences ont été réalisées à la même concentration d'aMb (1  $\mu\text{M}$ ), en solution (triangles), en présence de LUVs anioniques (cercles) ou de LUVs globalement neutres (carrés) à faible force ioniques (30 mM NaCl) (symboles blancs) et à forte force ionique (150 mM NaCl) (symboles noirs). **A** Suivi du ratio  $F_{320}/F_{365}$ . Le ratio molaire L/P est de 300 pour les expériences réalisées en présence de LUVs. **B** Expériences de partition de l'aMb avec les membranes suivies par centrifugation. Le ratio L/P est de 300. **C** Dépendance en pH des constantes de vitesse de perméabilisation ( $k_{\text{perfo}}$ ) de vésicules lipidiques. Les ratios L/P utilisés sont 350 et 400 pour les LUVs anioniques et globalement neutres respectivement. Les constantes de vitesse ont été normalisées par rapport aux ratios L/P. La flèche en B et C représente le début de la liaison de l'aMb aux LUVs détectée par les expériences de partition suivies par centrifugation. La flèche en A et C correspond au pH pour lequel les changements conformationnels sont détectés par fluorescence.



La Figure 73B montre les résultats obtenus lors des expériences de partition de l'aMb avec les LUVs suivies par centrifugation. La proportion d'aMb liée aux membranes ( $aMb_{\text{bound}}/aMb_{\text{tot}}$ ) est représentée en fonction du pH. La quantification de la protéine est effectuée par mesure de l'intensité de fluorescence à 330 nm. Après l'étape de centrifugation les LUVs vont se retrouver dans le culot amenant avec eux la protéine liée à la bicouche lipidique. Seule la protéine restée en solution sera alors présente dans le surnageant. Ainsi, les mesures d'intensité de fluorescence à 330 nm effectuée avant centrifugation ( $F_0$ ) et sur le surnageant après centrifugation ( $F$ ) permettent de déterminer la quantité de protéine liée à la bicouche lipidique ( $aMb_{\text{bound}}$ ) qui est alors égale à la différence de ces deux intensités de fluorescence  $(F-F_0)/F_0$ . Le ratio  $aMb_{\text{bound}}/aMb_{\text{tot}}$  représente donc  $(F-F_0)/F_0$ .

Les expériences réalisées en présence de LUVs anioniques et 30 mM NaCl (Fig. 73B○) montrent que la liaison de l'aMb débute dès pH 6,5 dans ces conditions. La protéine est complètement liée aux LUVs anioniques à pH 5,5. Lorsque les expériences de partition sont effectuées en présence de LUVs globalement neutres (Fig. 73B□), une très faible liaison à la membrane est détectée aux alentours de pH 3,5. Ce résultat souligne l'importance des interactions électrostatiques dans l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique. En présence de 150 mM NaCl (Fig. 73B●), la liaison de l'aMb aux LUVs anioniques est légèrement décalée vers des valeurs de pH plus acides.

Ainsi, les expériences de partition de l'aMb avec les membranes suivies par centrifugation montrent que, en présence de LUVs anioniques et 30 mM NaCl, la liaison de l'aMb à la bicouche lipidique débute dès pH 6,5. Toute la protéine est liée à la membrane à pH 5,5. Les changements de fluorescence (Fig. 73A○ et Fig. 72) sont quant à eux, observés entre pH 5,2 et pH 3,5. Il semble donc que la liaison de l'aMb aux LUVs anioniques soit un processus à 2 étapes. Dans la première étape, l'aMb se lie à la membrane (pH 6,5-pH 5,5). Cette première étape est délimitée par les deux flèches sur les graphiques. Dans la deuxième étape, les tryptophanes de la protéine pénètrent dans un environnement plus hydrophobe (pH 5,2-pH 3,5). Le début de la deuxième étape est indiqué par une flèche dans la Figure 73A et C.

Afin de déterminer si la liaison de l'aMb à la membrane a un effet sur la stabilité des vésicules lipidiques, des expériences de perméabilisation ont été effectuées. L'étude de la perméabilisation des vésicules lipidiques par l'aMb est effectuée par suivi de la libération d'un fluorophore, la pyranine, contenu initialement dans les vésicules lipidiques. Un « quencher » de la fluorescence de la pyranine, le DPX, est ajouté dans le tampon

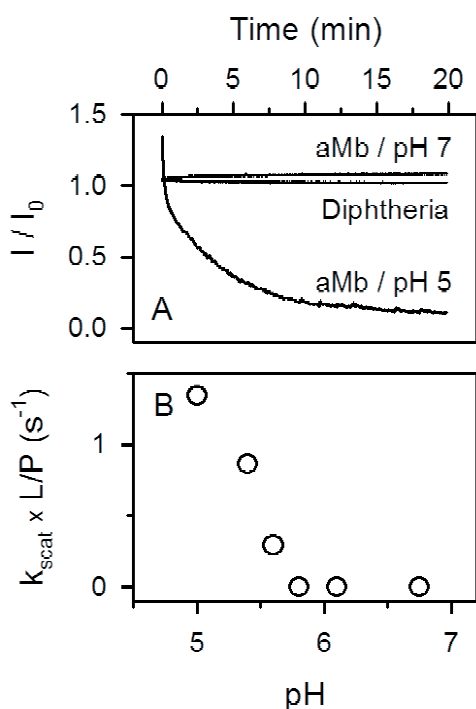
utilisé pour les expériences. Ainsi, la libération de la pyranine dans le milieu va avoir pour conséquence une extinction de sa fluorescence par le DPX. La diminution de l'intensité de fluorescence de la pyranine reflète donc la perméabilisation des vésicules lipidiques par l'aMb. Le protocole de cette expérience de perméabilisation bien que différent de celui employé lors de l'étude de l'interaction de Tm avec la bicouche lipidique, est basé sur le même principe : le suivi de l'intensité de fluorescence d'un fluorophore initialement « enfermé » dans des vésicules lipidiques au cours du temps. Les cinétiques de perméabilisation permettent ainsi de déterminer la constante de vitesse de perméabilisation des vésicules lipidiques par l'aMb ( $k_{\text{perfo}}$ ). C'est ce qui est représenté dans la Figure 73C. A pH neutre, lorsque l'aMb n'interagit pas avec les membranes, la libération de pyranine n'est pas observée. A faible concentration en sels en présence de LUVs anioniques (Fig. 73C○), la perméabilisation des vésicules lipidiques est détectée à partir de pH 5,5, c'est-à-dire lorsque toute la protéine est liée aux membranes (Fig. 73B○). La perméabilisation des LUVs anioniques dans ces conditions est également concomitante avec le début de changement d'environnement des Trps (Fig. 73A○) qui a lieu lors de la deuxième phase de l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique. Il semble donc que la perméabilisation de LUVs anioniques à faible force ionique soit corrélée avec la deuxième étape de l'interaction de l'aMb avec les LUVs anioniques.

L'aMb perméabilise très peu les LUVs globalement neutres (Fig. 73C□), ce qui est en bonne corrélation avec la faible liaison observée dans la Figure 73B□. De même que pour les expériences de liaison (Fig. 73B●), l'augmentation de la concentration en NaCl induit un léger déplacement du début de la perméabilisation des LUVs anioniques vers des pHs plus acides.

### **III - Effet de l'aMb sur les vésicules lipidiques lors de son interaction**

Le ratio L/P nécessaire à la perméabilisation des LUVs anioniques (L/P ~300) est très supérieur à celui requis pour les toxines bactériennes (L/P~3000) (Chenal *et al.*, 2002). Une plus grande quantité de protéine est donc requise pour la perméabilisation dans le cas de l'aMb. Le mécanisme de perméabilisation des membranes par l'aMb pourrait impliquer la formation d'un pore ou bien la fragmentation des vésicules lipidiques. Dans les deux cas, l'extinction de la fluorescence de la pyranine serait observée lors des expériences de perméabilisation. La fragmentation de vésicules lipidiques par l'aMb a déjà été décrite

(Lee & Kim, 1992) lors d'expériences de microscopie électronique. Ces expériences montrent l'accumulation de micelles et la formation de larges complexes lors de l'addition d'aMb sur des LUVs. La fragmentation des vésicules lipidiques peut être suivie par diffusion de lumière. Elle a pour effet de diminuer cette diffusion. Des expériences de diffusion de lumière ont donc été effectuées de façon à suivre l'évolution de l'état des vésicules lipidiques en présence d'aMb (Fig. 74).



**Figure 74 : Evolution de la diffusion de la lumière de LUVs en présence d'aMb.** *A* L'évolution de la diffusion de lumière est suivie grâce au rapport des intensités de lumière diffusée avant ( $I_0$ ) et après ajout de protéine ( $I$ ) en fonction du temps. Les cinétiques représentées ont été obtenues pour l'aMb (1  $\mu$ M) en présence de LUVs anioniques (L/P 350) et 30 mM NaCl à pH 7 et pH 5 et avec le domaine de translocation de la toxine diphtérique (DT) (100 nM) en présence de LUVs anioniques (L/P 3000) pH 5. *B*. Dépendance en pH de l'évolution des constantes de diffusion de lumière ( $k_{scat}$ ).

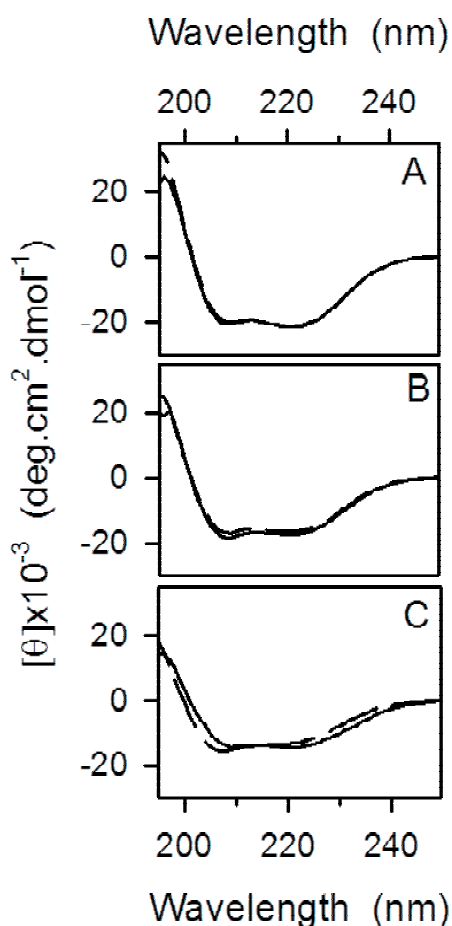
Le domaine de translocation de la toxine diphtérique (DT) a été utilisé comme contrôle (Fig. 74A). Les conditions utilisées sont celles connues pour induire la perméabilisation de vésicules lipidiques par DT (LUVs anioniques, L/P 3000, tampon Citrate à pH 5) (Chenal *et al.*, 2002). Le rapport  $I/I_0$  n'évolue pas en fonction du temps, indiquant que la perméabilisation de LUVs anioniques par DT ne passe pas un mécanisme induisant la lyse des vésicules lipidiques.

Dans le cas de l'aMb, le rapport  $I/I_0$  reste également constant en fonction du temps, à pH 7 (Fig. 74A). Ce résultat est en bonne corrélation avec les expériences de partition suivies par centrifugation (Fig. 73B○) qui ont montré qu'à ce pH, l'aMb n'est pas lié à la bicouche lipidique. A pH 5, le rapport décroît en fonction du temps. Cela signifie que l'intensité de lumière diffusée diminue avec le temps par rapport à l'intensité initiale ( $I_0$ ) avant ajout de protéine. La perméabilisation des LUVs anioniques par l'aMb induit donc une fragmentation des vésicules lipidiques. La dépendance en pH de la constante de diffusion de lumière ( $k_{scat}$ ) (Fig. 74B) montre que la fragmentation des LUVs anioniques

par l'aMb débute dès pH 5,5, lorsque la protéine est complètement liée à la bicouche lipidique (Fig. 73B○). Cela suggère que l'aMb se lie d'abord aux LUVs anioniques puis les fragmente.

#### **IV - Changements structuraux**

Des spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain ont été effectués pour observer l'évolution de la structure secondaire de l'aMb lors de sa liaison aux LUVs anioniques. La Figure 75 représente les spectres de dichroïsme circulaires dans l'UV lointain obtenus pour l'aMb en présence de LUVs anioniques à pH 7, pH 5,5 et pH 4.



*Figure 75 : Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV-lointain de l'aMb en présence de LUVs anioniques (—) et en solution (---). La concentration en aMb est de 2,5μM pour toutes les expériences. Le ratio L/P utilisé est 300. A pH 7, B pH 5,5, C pH 4.*

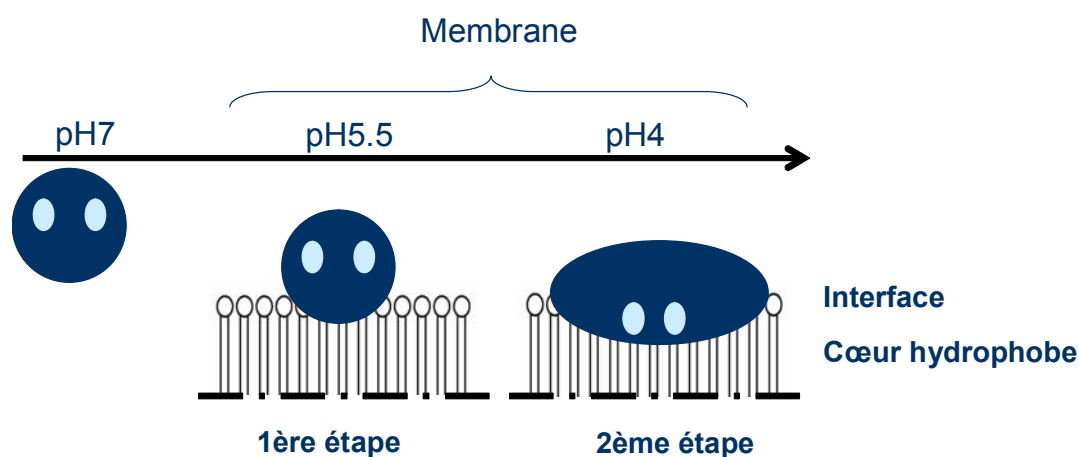
Le spectre de l'état natif de l'aMb à pH 7 en solution (Fig. 75A---) possède deux minima à 208 nm et 222 nm caractéristiques d'une protéine dont les structures secondaires sont repliées en hélices  $\alpha$ . Le spectre obtenu en présence de LUVs anioniques à pH 7 (Fig. 75A—) est identique à celui obtenu pour la protéine en solution. Dans ces conditions,

l'aMb n'interagit pas avec la bicouche lipidique, il était donc prévisible que la présence de LUVs anioniques n'influe pas la structure secondaire de la protéine. Le spectre enregistré à pH 5,5 (Fig. 75B---) pour la forme soluble de l'aMb est similaire à celui obtenu à pH 7 (Fig. 75A---). Pour la protéine en présence de LUVs anioniques à pH 5,5 (Fig. 75B—), il n'y a pas de différence significative par rapport à la protéine seule en solution au même pH (Fig. 75B---). Des changements sont observés sur le spectre de l'aMb en solution à pH 4 (Fig. 75C---). Le minimum à 208 nm est légèrement plus prononcé que celui à 222 nm. Cela est dû à une diminution du contenu en hélice  $\alpha$  de la protéine en solution à pH 4 (Griko *et al.*, 1988), (Hughson *et al.*, 1990), (Barrick et Baldwin 1993), (Kataoka *et al.* 1995), (Gulotta *et al.*, 2003), (Eliezer *et al.*, 1998), (Kay et Baldwin, 1998). Cependant la structure secondaire de l'aMb en solution à pH 4 reste très proche de celle à pH 7. En présence de LUVs anioniques à pH4 (Fig. 75C—), le minimum à 208 nm est légèrement plus prononcé qu'en solution, signe que la liaison de l'aMb aux LUVs anioniques stabilise la structure secondaire de la protéine.

## C – CONCLUSIONS

La liaison de l'apomyoglobine à la membrane est donc un phénomène dépendant du pH. L'aMb interagit avec des LUVs anioniques à pH acide et la présence de lipides chargés négativement est nécessaire à la liaison de l'aMb.

Deux étapes dépendantes du pH peuvent être distinguées lors du processus d'interaction de l'aMb avec les LUVs anioniques. La première étape a été identifiée grâce aux expériences de partition suivie par centrifugation (Fig. 73B). Elle consiste en la liaison de l'aMb à la bicouche lipidique. La seconde étape est quant à elle, associée au changement d'environnement des tryptophanes situés dans l'hélice A, (Fig. 72 et Fig. 73A) et à la perméabilisation des LUVs anioniques. Ces observations suggèrent que l'aMb est insérée plus profondément dans la bicouche lipidique dans cette deuxième étape. D'autre part, en accord avec l'étude de Lee & Kim (1992), la perméabilisation des LUVs anioniques à pH acide est associée à leur fragmentation (Fig. 74). Les étapes de l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique sont résumées dans la Figure 76.



**Figure 76 : Schéma récapitulatif de l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique.**

Les ovales bleu clair représentent les Trps situées dans l'hélice A. A pH 7, l'aMb est dans sa conformation native et n'interagit pas avec la bicouche lipidique. A pH 5,5, la protéine est liée à la membrane. Puis avec l'acidification du pH, un état partiellement replié s'accumule. A pH 4, les Trps de l'aMb sont exposés à un milieu hydrophobe et l'aMb est plus profondément insérée dans la bicouche lipidique.

Les spectres de dichroïsme circulaire (Fig. 75) de l'aMb en fonction du pH montrent que la protéine conserve une structure secondaire proche de celle de l'état natif dans la gamme de pH favorable à son interaction avec les LUVs anioniques. De plus, les expériences de fluorescence intrinsèque (Fig. 72) indiquent qu'un état partiellement replié, dit « molten-globule » de l'aMb est stabilisé en solution à pH 4 et qu'en présence de LUVs anioniques, dans les mêmes conditions de pH, les tryptophanes sont dans un environnement hydrophobe. Tout cela laisse suggérer que l'interaction de l'aMb avec les LUVs anioniques nécessite la perte de la structure tertiaire de la protéine et la stabilisation d'un état partiellement replié à cette étape de l'interaction avec la bicouche lipidique. Dans cet état partiellement replié, la protéine a perdu sa structure tertiaire et conserve seulement ses structures secondaires. Il est généralement associé à la liaison des protéines amphitropiques aux membranes (van der Goot, 1991), (Zahn *et al.*, 1994 et 1995), (Zakharov *et al.*, 1998), (Chenal *et al.*, 2002). Cependant, dans le cas présent nous n'avons pas de preuve directe de la perte de structure tertiaire.

L'apomyoglobine a donc des caractéristiques communes avec d'autres protéines de la famille globine telles que certains domaines de toxines bactériennes (Holm & Sander, 1993a et b). Leur interaction avec les membranes est dépendante du pH et requiert la présence de phospholipides négatifs (Parker & Feil, 2005). De plus, cette interaction avec les membranes est corrélée avec l'apparition d'un état partiellement replié qui a les caractéristiques de l'état dit « molten-globule ». Cette similarité dans le mode d'interaction

avec les membranes est particulièrement flagrante avec le domaine de translocation de la toxine diphtérique (Chenal *et al.*, 2002) (Montagner *et al.*, 2007). Ainsi, le domaine de translocation de la toxine diphtérique (DT) subit des changements conformationnels lors de l'acidification du pH, conduisant à l'apparition d'un état « molten-globule » apte à interagir avec la bicouche lipidique. L'interaction de DT avec les membranes comprend deux étapes tout comme dans le cas de l'apomyoglobine. Dans la première étape, la DT se lie à l'interface de la bicouche lipidique, puis s'insère dans la bicouche lipidique à pH plus acide dans une deuxième étape.

Cette étude nous a permis de déterminer le mode d'interaction de l'aMb avec les membranes et de constater que celui-ci est commun avec celui adopté par un grand nombre de protéines appartenant à la famille globine (certains domaines de toxines bactériennes, les protéines de la famille de Bcl-2). Cependant, nous n'avons pas déterminé quelles étaient les régions de l'apomyoglobine en contact avec les lipides ni la conformation de l'aMb liée aux membranes. Pour ce faire, nous avons décidé d'effectuer des échanges Hydrogène/Deutérium (H/D) couplés à une analyse par spectrométrie de masse.





*EXPERIENCES  
D'ECHANGES  
HYDROGENE/DEUTERIUM  
SUIVIES PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE*



Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire de spectrométrie de masse des protéines de l'IBS à Grenoble dirigé par Eric Forest.

Le but de ce type d'expérience est de mettre au point une méthodologie permettant de localiser les régions d'une protéine en contact avec les lipides grâce à des expériences d'échange H/D analysés par spectrométrie de masse. Pour ce faire, nous avons utilisé une protéine modèle : l'apomyoglobine dont le repliement et le mode d'interaction avec la bicouche lipidique sont retrouvés pour certaines toxines bactériennes ainsi que pour les membres de la famille de Bcl-2 impliqués dans la régulation de l'apoptose.

## A - INTRODUCTION

Les échanges Hydrogène/Deutérium (échanges H/D) apportent des informations sur la stabilité des protéines. En règle générale ils sont couplés à une analyse par RMN ou spectrométrie de masse pour l'étude de la dynamique et de la structure des protéines en solution (Burns-Hamuro *et al.*, 2005), (Cravello *et al.*, 2003 ). Cette méthode a déjà été employée pour l'étude de protéines amphitropiques liées aux membranes ; dans ce cas, l'expérience d'échange H/D est couplée à la RMN (Pinheiro *et al.*, 2000), (Halskau *et al.*, 2000), (Chenal *et al.*, 2005). Cela permet de déterminer les régions de la protéine en contact avec les lipides au résidu près.

Cependant, l'analyse par RMN impose quelques limitations, notamment concernant le poids moléculaire des protéines. Elle nécessite également que l'interaction protéine-membrane soit réversible, afin de récupérer la protéine seule en solution. Or, il n'est pas toujours possible de lever facilement de telles interactions comme c'est le cas par exemple pour le domaine de translocation de la toxine diphtérique. Enfin, la structure tertiaire de la protéine doit être stable, ce qui n'est possible qu'en présence de co-facteur (les co-facteurs sont également utilisés pour lever l'interaction protéine-membrane). La spectrométrie de masse permet l'analyse de protéines de hauts poids moléculaires. Sa résolution est plus faible que celle de la RMN mais peut être améliorée en ajoutant dans le processus d'analyse une étape de digestion enzymatique. L'analyse de la protection contre les échanges isotopiques des fragments peptidiques obtenus permettra de localiser les régions de la protéine en contact avec les lipides.

Les expériences d'échange H/D couplées à la spectrométrie de masse permettent donc la détermination de régions de la protéine en contact avec des lipides et ce sans

nécessité de lever l'interaction protéines-lipides ou de stabiliser la structure de la protéine en solution. Cela en fait donc une méthode intéressante pour la détermination des régions impliquées dans l'interaction avec la membrane de certaines protéines amphitropiques dont l'interaction avec la bicouche lipidique requiert le passage par un état partiellement replié dit « molten-globule ».

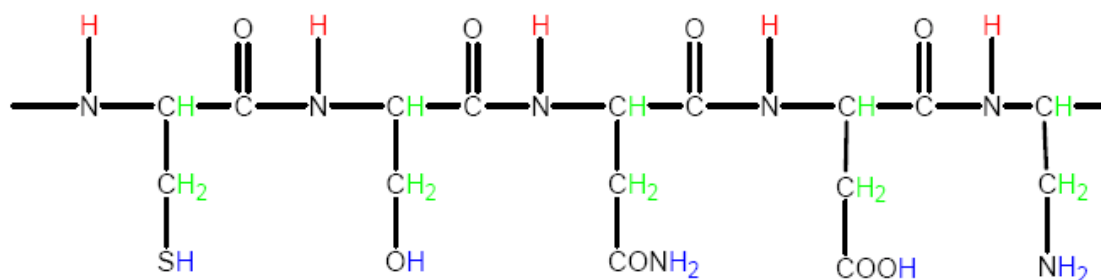
Pour mettre au point cette méthode nous avons choisi de travailler avec l'apomyoglobine (aMb) dont le processus d'interaction avec la bicouche lipidique est caractérisé (cf. Chapitre précédent). Cette interaction est dépendante du pH et se déroule en deux étapes. L'aMb se lie d'abord superficiellement à la membrane à pH 5,5. Puis avec l'acidification du pH, un état partiellement replié se forme et s'accumule. Cela conduit à une insertion plus profonde de la protéine dans la bicouche lipidique à pH 4.

Nous nous sommes attachés à définir les régions de l'apomyoglobine impliquées dans l'interaction avec des LUVs anioniques au cours des deux étapes décrites précédemment.

## **B - PRINCIPES DES ECHANGES H/D**

### **I - Les protons échangeables**

Les chaînes polypeptidiques contiennent différents types de protons (Fig. 77). Trois groupes d'hydrogène peuvent être distingués : les hydrogènes aliphatiques et aromatiques, les hydrogènes labiles des chaînes latérales des acides aminés et les hydrogènes des fonctions amino et carboxy-terminale des chaînes polypeptidiques. Le troisième groupe comprend les hydrogènes amides des liaisons peptidiques. Les hydrogènes aliphatiques et aromatiques ne sont pas échangeables. Contrairement aux hydrogènes labiles des chaînes latérales et ceux des liaisons amides du squelette peptidique.



*Figure 77 : Les protons dans la protéine : Sont représentés en vert les protons liés de façon covalente aux carbones du squelette peptidique et dans les chaînes latérales des acides aminés. Ces protons ne sont pas échangeables. Les protons colorés en bleu sur le schéma sont échangeables contre un deutéron, mais la vitesse d'échange est trop rapide pour qu'avec le dispositif expérimental nous ayons accès à leur échange. Enfin, le dernier type de proton que l'on peut trouver dans une protéine est représenté en rouge. Il s'agit des protons amide de la liaison peptidique. C'est leur échange avec les deutérons qui est observé dans ces expériences.*

Les hydrogènes échangeables peuvent s'échanger avec les hydrogènes d'un solvant protique ou les deutériums de celui-ci, s'il est deutéré. L'échange d'un hydrogène contre un deutérium a pour conséquence un incrément de masse de la protéine aisément observable par spectrométrie de masse. Les vitesses d'échange des protons des chaînes latérales sont trop rapides pour que les échanges isotopiques puissent être observés. Ce n'est pas le cas des protons amides. De plus, les hydrogènes des liaisons peptidiques sont présents sur toute la longueur de la protéine et leur vitesse d'échange est variable dans une protéine structurée. Ainsi, le suivi des échanges H/D au niveau des protons amides donne des informations sur la structure globale et locale des protéines. Nous expliquerons cela en détail plus loin dans ce chapitre.

## **II - Facteurs influençant la vitesse d'échange isotopique**

La vitesse d'échange isotopique dépend de l'environnement, de la structure de la protéine et de l'accessibilité au solvant. Ainsi, les protons amides situés dans des régions non structurées d'une protéine sont échangés en quelques secondes dans du D<sub>2</sub>O à pH neutre. Dans le cas de protons amides impliqués dans une liaison hydrogène ou enfoui dans le cœur de la protéine, le temps d'échange peut aller jusqu'à un mois. Il en résulte que la vitesse d'échange isotopique diminue lorsque les protons amides sont moins accessibles au solvant, du fait de leur implication dans des liaisons hydrogènes, de leur enfouissement dans le cœur de la protéine ou de leur liaison aux membranes. La Figure 78 illustre l'échange des protons amides d'une protéine avec des deutériums du solvant.

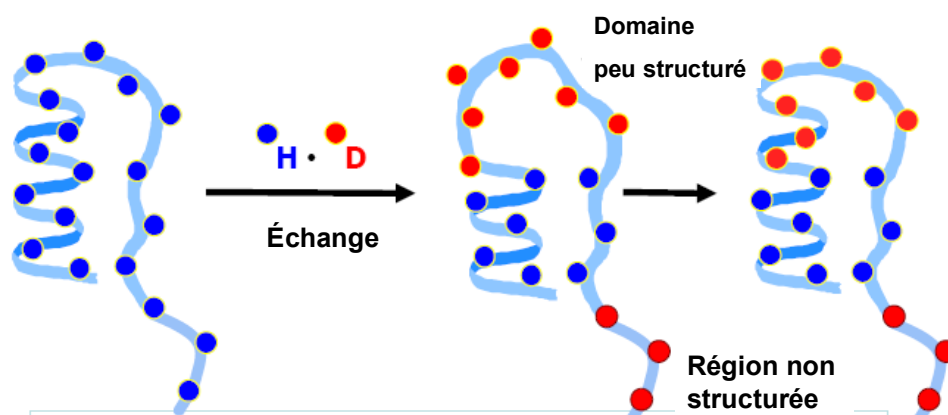


Figure 78 : Schéma des échanges H/D au niveau des protons amides d'une protéine. Les hydrogènes amides sont représentés en bleu sur la protéine hydrogénée.

Tout cela confère une grande sensibilité des échanges isotopiques des protons amides pour la détection et la localisation de régions enfouies dans le cœur des protéines ou impliquées dans la liaison à la bicouche lipidique par exemple.

La vitesse d'échange H/D est également sensible aux propriétés physico-chimiques de l'environnement. Le pH, la nature des résidus voisins ainsi que la température sont les principaux facteurs influençant cette vitesse d'échange isotopique. Le pH est sûrement le facteur le plus important. Ainsi, les échanges H/D sont-ils le résultat d'une catalyse acide ou basique par les molécules d'eau. La constante de vitesse d'échange ( $k_{ex}$ ) peut donc être exprimée comme la somme de composante acides ou basiques :  $k_{ex} = k_H[H^+] + k_{OH}[OH^-]$  Somme dans laquelle  $k_H$  et  $k_{OH}$  sont les constantes de vitesses d'échange en milieu acide et basique respectivement. La dépendance en pH des vitesses d'échange isotopiques est minimale entre pH 2 et pH 3. Cela est illustré dans le Figure 79 avec l'exemple d'une polyalanine.

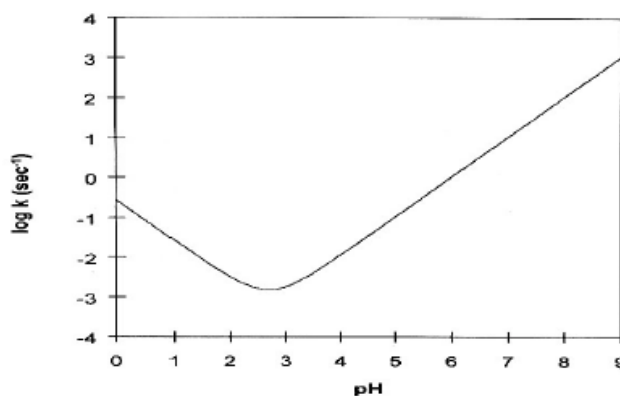


Figure 79 : Influence du pH sur la vitesse des échanges H/D. Cas d'une polyalanine D'après Englander et Kallenbach 1984.

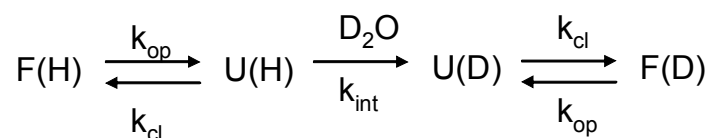
En dehors de la zone où les vitesses d'échange sont minimales, une modification d'une unité de pH entraîne une variation de la vitesse d'échange d'un facteur 10 (Bai *et al.*, 1993). Les variations de pH sont donc très souvent utilisées pour faire varier les vitesses d'échange ou encore arrêter les échanges. De même une baisse de température de 10°C entraîne la diminution de la vitesse d'échange d'un facteur 3.

En plus de leur sensibilité au pH et à la température, les vitesses d'échanges des protons amides sont également influencées par la polarité et la taille des chaînes latérales des résidus voisins. Des mesures de vitesses intrinsèques d'échange ont été effectuées par RMN pour chaque acide aminé dans diverses séquences peptidiques (Bai *et al.*, 1993). Ces expériences ont fourni les valeurs de vitesse d'échange intrinsèque pour chaque acide aminé dans un environnement peptidique donné.

### **III - Mécanismes des échanges H/D**

L'échange isotopique dans une protéine est relativement complexe du fait de l'inhomogénéité du milieu. D'autre part, un proton amide ne peut s'échanger avec le milieu que s'il est accessible au solvant et n'établit pas de liaison hydrogène avec son environnement. C'est le cas de protons amides présents à la surface des protéines et dans des régions présentant une certaine flexibilité structurale ou complètement déstructurées. Ce cas de figure est cependant rarement rencontré dans une protéine structurée pour laquelle les protons amides sont le plus souvent impliqués dans des liaisons hydrogènes stabilisant la structure secondaire ou enfouis dans le cœur hydrophobe de la protéine. Ce sont des dépliements locaux ou à plus grande échelle qui permettent alors de rendre accessibles au solvant ces protons (Engen & Smith, 2000). Ces phénomènes ont lieu grâce à l'agitation thermique qui, même dans des conditions de stabilité optimale pour la protéine permet des dépliements de plus ou moins grande amplitude. Dans ces conditions, l'échange isotopique d'un proton amide relativement accessible au solvant nécessitera un dépliement local de faible amplitude, celui au niveau d'un proton amide plus enfoui nécessitera un dépliement global de la protéine de plus grande amplitude. Ainsi la vitesse d'échange H/D dépend donc directement de la structure de la protéine et de sa dynamique.

Le mécanisme d'échange H/D suit alors le chemin suivant :



La forme native F est complètement hydrogénée (H). L'ouverture de sa structure au solvant dépend de sa constante de vitesse d'ouverture  $k_{op}$ . La protéine dépliée U peut quant à elle librement échanger ses protons avec les deutérons du solvant avec une constante de vitesse intrinsèque ( $k_{int}$ ) dépendante uniquement du résidu en question et de ses voisins et non de la structure de la protéine. Après l'échange, la protéine peut se replier à une vitesse  $k_{cl}$ .

Ainsi la constante de vitesse d'échange apparente  $k_{ex}$  peut être décrite par la relation suivante :

$$(1) \quad k_{ex} = \frac{k_{op}k_{int}}{k_{op}+k_{int}+k_{cl}}$$

Cette équation est simplifiée en considérant que  $k_{cl}$  est très grand devant  $k_{op}$  pour une protéine native. La vitesse d'échange variant entre deux limites suivant les valeurs de  $k_{int}$  et  $k_{cl}$  (Hvidt &Nielsen, 1966).

Dans le cas limite appelé EX1, les fluctuations structurales sont lentes devant la vitesse d'échange :  $k_{cl} \ll k_{int}$ . La relation (1) s'écrit alors :

$$(2) \quad k_{ex} = k_{op}$$

Les cinétiques de type EX1 sont caractérisées par la corrélation entre échange isotopique et dépliement de la protéine, indépendamment du pH. Ainsi à chaque fois qu'un segment polypeptidique se déplie tous les protons amides s'échangent avec les deutérons du solvant. Ce cas est très peu fréquent pour les protéines, contrairement au mécanisme de type EX2.



Dans le cas limite EX2, bien plus probable pour une protéine structurée, les fluctuations structurales sont beaucoup plus rapides que la vitesse d'échange isotopique  $k_{cl} \gg k_{int}$  l'équation (1) s'écrit alors :

$$(3) \quad k_{ex} = \frac{k_{op}k_{int}}{k_{cl}} = K_{unf}k_{int}$$

$K_{unf}$  est la constante d'équilibre du dépliement de la protéine. La détermination de  $k_{ex}$  avec les valeurs de  $k_{int}$  données dans la littérature donne directement accès à  $K_{unf}$ . Ainsi la mesure des vitesses d'échanges dans le cas d'un mécanisme EX2 donne accès à la thermodynamique des changements conformationnels :

$$K_{unf} = k_{ex}/k_{int}$$

Par conséquent

$$\Delta G_{HD} = -RT \ln K_{unf}$$

La mesure de la vitesse d'échange donne ainsi accès à la variation d'énergie libre de dépliement de la protéine.

**D - RESULTATS**

**I - Cartographie de l'apomyoglobine**

Cartographier l'apomyoglobine est un préalable indispensable aux échanges H/D. En effet, l'analyse des peptides obtenus après digestion enzymatique fournit des informations à l'échelle « locale » sur les échanges H/D. La carte peptidique obtenue après digestion de l'aMb par la protéase de type XIII et la pepsine est représentée dans la Figure 80. L'analyse a été réalisée par LC-MS/MS (Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry). La digestion à la pepsine (représentée en gris Fig. 80) a permis d'obtenir 20 peptides couvrant la totalité de la séquence de la protéine. Cependant certains d'entre eux sont très longs. Cela a pour conséquence une baisse dans la résolution pour l'identification de ces peptides, donc une perte d'information sur les échanges H/D ayant eu lieu au niveau de ces peptides. C'est pourquoi, nous avons digéré l'aMb avec une autre protéase : la protéase de type XIII (Fig. 80 en noir). La digestion par cette protéase résulte en 27 peptides, dont l'analyse est également réalisée par LC-MS/MS. Comme après digestion par la pepsine, les peptides obtenus après clivage par la protéase de type XIII permettent de recouvrir la totalité de la séquence de l'apomyoglobine.

D'autre part, l'établissement de la carte peptidique après digestion de l'aMb par ces deux protéases montrent plusieurs peptides chevauchants. Ces peptides ont la propriété d'avoir en commun un morceau de leur séquence soit dans leur partie N-terminale soit dans leur partie C-terminale. Ceci est très intéressant, notamment si les régions de la protéine pour lesquelles ces peptides chevauchants ont été obtenus, sont impliquées dans l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique. En effet, cela permettrait d'augmenter la précision dans la détermination des régions impliquées.



**Figure 80 : Carte peptidique de l'aMb.** Les peptides obtenus par digestion par la protéase de type XIII (noir) et la pepsine (gris) sont représentés par les flèches en dessous de la séquence de la protéine. Les hélices A à H sont représentées par des rectangles situés au dessus de la séquence correspondante dans la protéine. Les lignes représentent les régions non structurées de l'aMb.

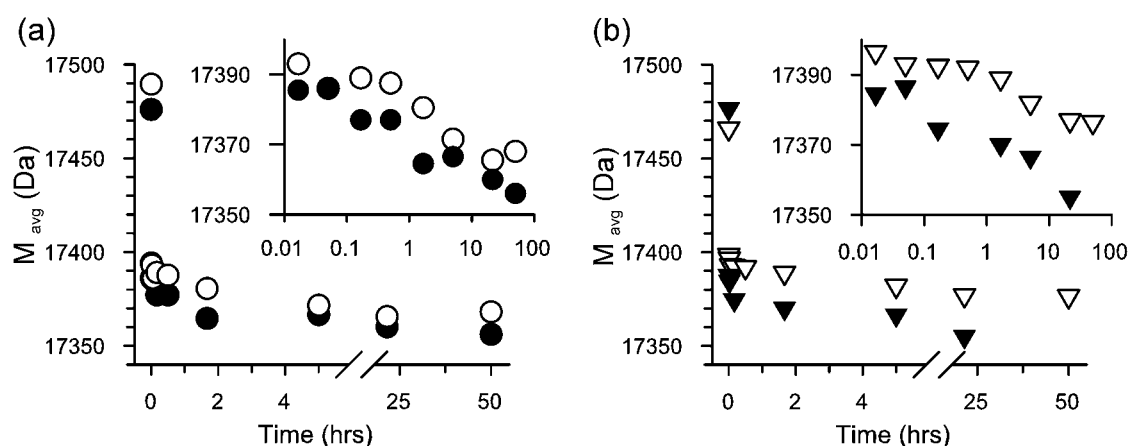
## II - Cinétiques globales d'échange H/D

Dans un deuxième temps, les cinétiques dites globales ont été effectuées. Nous avons choisi d'effectuer des échanges Deuterium/Hydrogène et non Hydrogène/Deutérium. Cette méthode est utilisée moins fréquemment (Mandell *et al.*, 1998). Nous l'avons employé de façon à éviter des re-échanges lors du mélange de la fraction aliquote avec la matrice hydrogénée utilisée lors des analyses en MALDI.

Les cinétiques globales ont pour but d'observer des différences de protection contre les échanges D/H lors des cinétiques réalisées pour l'aMb en solution et en présence de membranes. Ces deux valeurs de pH ont été choisies car il a été montré que l'apomyoglobine interagit avec les membranes dans un processus à deux étapes impliquant également des changements conformationnels de la protéine (Vernier *et al.*, 2007). Ce sont donc quatre cinétiques d'échange D/H qui sont effectuées en parallèle : en solution et en présence LUVs anioniques à pH 4 et pH 5,5. Le but est de comparer d'une part l'évolution de la masse moyenne de l'aMb au cours du temps pour un même pH en solution et en présence de LUVs anioniques, mais également de comparer les résultats obtenus à pH 4 et pH 5,5.

Les expériences de cinétique d'échange D/H sont réalisées en chambre froide (4°C). L'aMb complètement deutérée dans un tampon citrate à pD 4 ou pD 5,5 est mise en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA 9 :1) à un ratio molaire L/P 300. La concentration finale en protéine est de 26 µM. Le mélange réactionnel est incubé 2 heures

à température ambiante. L'échange isotopique est initié par dilution rapide au dixième dans un tampon citrate hydrogéné au pH souhaité. Des fractions aliquotes sont prélevées à différents temps (de la minute à l'heure). L'échange isotopique est alors arrêté en diminuant le pH par addition d'acide phosphorique et congélation rapide des fractions dans l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant analyse par spectrométrie de masse MALDI (Matrix-Assisted Laser desorption Ionization). Chaque échantillon est décongelé et  $0,5\ \mu\text{L}$  sont déposés sur la plaque et mélangés avec la matrice du MALDI composée d'acide sinapinique. Le mélange est rapidement séché sous flux d'azote. Le spectre MALDI est ensuite acquis. Trois mesures sont réalisées pour chaque échantillon, avec une calibration externe. Cette procédure est répétée pour chaque échantillon. Les trois masses mesurées pour chaque temps de cinétique sont moyennées. Ainsi, c'est l'évolution de la masse moyenne qui est représentée en fonction du temps (Fig. 81).



**Figure 81 :** Cinétiques globales d'échange D/H à pH 5,5 (a) et pH 4 (b) effectuées pour l'aMB en solution et en présence de LUVs anioniques (EPC/EPA 9 :1) à un ratio molaire L/P 300. Les inserts montrent les mêmes cinétiques avec une échelle logarithmique pour le temps en abscisse. Les symboles ont la signification suivante : aMb en présence de LUVs anioniques à pH 4 (▽); aMb en solution à pH 4 (▼); aMb en présence of LUVs anioniques à pH 5.5 (○); aMb en solution à pH 5.5 (●).

L'apomyoglobine possède 265 protons échangeables dont 149 protons amides. La masse moléculaire de l'aMb hydrogénée est de 17331 Da. Les masses attendues pour la protéine sont donc de 17596 Da et 17480 Da lorsque tous les protons échangeables de l'aMB sont deutérés et seuls les protons amides ont été remplacés par des deutériums respectivement. Selon les conditions expérimentales, la masse moyenne de l'aMb au temps 0 h de la cinétique varie entre 17470 et 17490 Da. Ces masses mesurées sont très proches de celle attendue pour l'aMb deutérée sur tous ses protons amides (17480 Da). De plus, le pourcentage d'erreur en spectrométrie MALDI-TOF est estimé à 0,1%. Nous pouvons

donc considérer que au commencement des échanges isotopiques l'aMb est complètement deutérée uniquement sur ses protons amides. Les protons échangeables des chaînes latérales sont donc tous hydrogénés. Leur échange isotopique très rapide, a très probablement eu lieu lors du mélange de la fraction aliquote avec la matrice hydrogénée lors du dépôt sur la plaque.

La Figure 81a et b montre que après une minute d'échange, les masses moyennes sont comprises entre 17385 et 17395 Da selon les conditions expérimentales. Cela signifie que nous aurons seulement accès à 40 % de l'échange isotopique des protons amides. La majorité des protons amides (60 %) a été échangée dans cette première minute de cinétique et le dispositif expérimental ne nous permet pas d'y accéder. D'autre part, dès une minute de cinétique, la masse moyenne mesurée en présence de LUVs anioniques est légèrement supérieure à celle mesurée lorsque l'aMb est en solution, à pH 4 et pH 5,5. Cette différence est plus visible dans les inserts de la Figure 81a et b. Cela indique que l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique ralentit les échanges H/D. Cette différence est plus prononcée à pH 4. Cela indique une plus grande protection contre les échanges isotopiques de la protéine en présence de membranes.

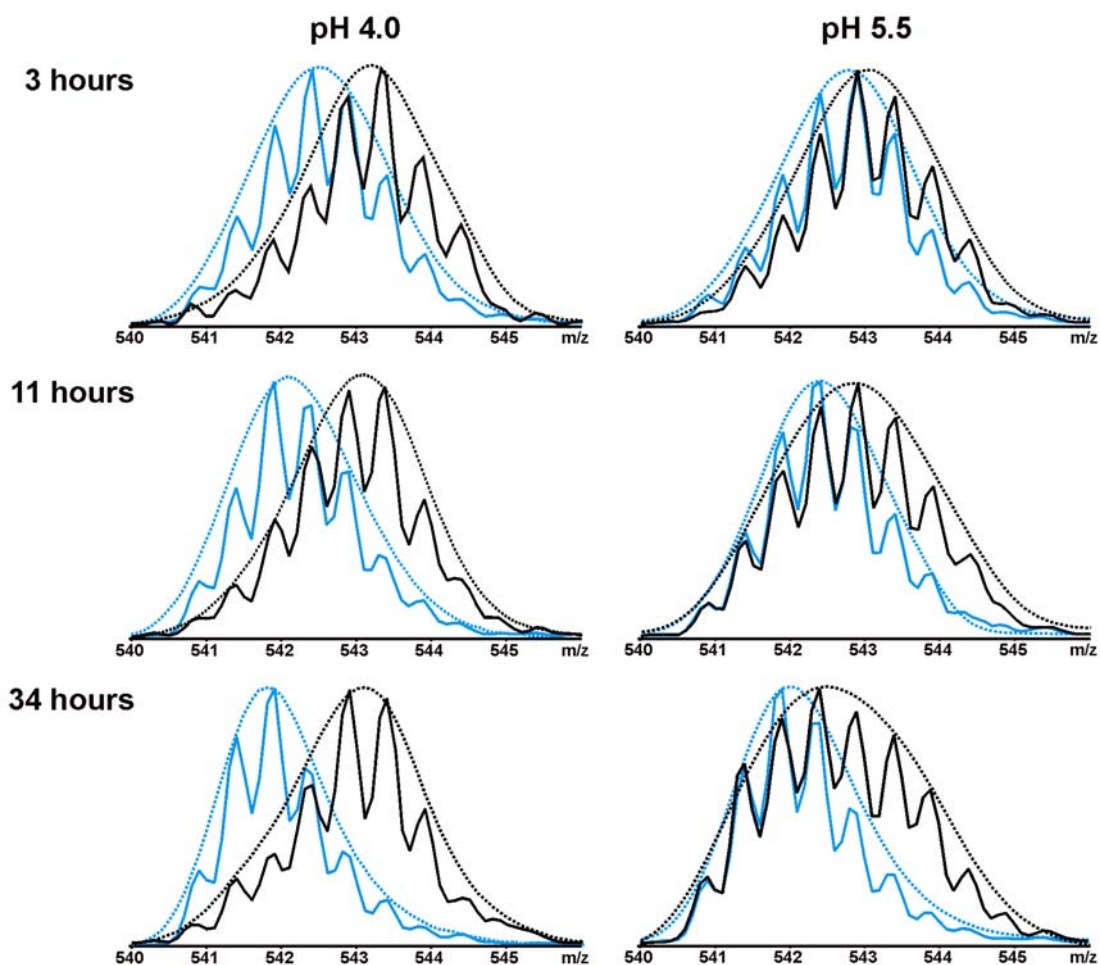
A pH 5,5 (Fig. 81a), quelques amides sont encore protégés de l'échange isotopique à 50 h de cinétique. L'insert de la Figure 81b montre les expériences réalisées à pH4. Dans ce cas, quelques amides sont encore protégés de l'échange H/D au bout de 50 h de cinétique. Cependant, la différence de masse pour l'aMb en solution et en présence de LUVs anioniques est d'environ 25 Da. Cela laisse supposer que à pH 4, la protection contre les échanges H/D est plus grande qu'à pH 5,5. Ces résultats sont en bonne corrélation avec ceux obtenus précédemment (Vernier *et al.*, 2007). En effet, il a été montré que l'aMb interagit avec la bicouche lipidique en deux étapes dépendantes du pH. Dans une première étape, entre pH 6,5 et pH 5,5, la protéine se lie à la bicouche lipidique de façon superficielle. Avec l'acidification du pH l'aMb subit des changements conformationnels conduisant à l'accumulation d'un état partiellement replié à pH 4, c'est alors que la protéine s'insère plus profondément dans la bicouche. Cette insertion plus profonde dans la bicouche explique la plus grande protection contre les échanges isotopiques observée à pH 4.

### **III - Cinétiques locales d'échange H/D**

Afin de localiser les régions de l'apomyoglobine impliquées dans l'interaction avec la bicouche lipidique, des cinétiques locales ont été réalisées. L'échange isotopique se déroule de la même façon que celle décrite pour les cinétiques globales. Cependant une étape supplémentaire est ajoutée avant analyse par spectrométrie de masse. Les fractions recueillies après 3 h, 6 h, 11 h, 25 h et 34 h de cinétique sont digérées par la pepsine et la protéase de type XIII. Ces deux digestions résultent en un recouvrement complet de la séquence de l'aMb (Fig. 80).

#### **III.1 - Détails de profils isotopiques pour des ions doublement chargés : exemple du peptide 8-15**

La comparaison des profils isotopiques moyens obtenus pour chaque peptide dans les différentes conditions testées permet également d'observer s'il existe des différences de deutération dues à l'interaction de l'aMb avec les LUVs anioniques. Cette analyse des cinétiques locales donne une estimation de l'influence des vésicules lipidiques sur la vitesse d'échange particulièrement dans le cas d'ions simplement ou doublement chargés. La Figure 82 montre les profils isotopiques obtenus pour le peptide 8-15 à pH 4 et pH 5,5 à 3 h, 11 h et 34 h de cinétique en solution (bleu) et en présence de LUVs anioniques (noir). A pH 4, en solution, les profils isotopiques de la protéine en solution sont déplacés vers des masses plus faibles tout au long de la cinétique (Fig. 82 bleu). Cela indique que les deutérons présents initialement sur le peptide s'échangent avec les protons du solvant. Au contraire, en présence de LUVs anioniques (Fig. 82 noir), la valeur m/z du profil évolue peu : le peptide est protégé des échanges isotopiques.

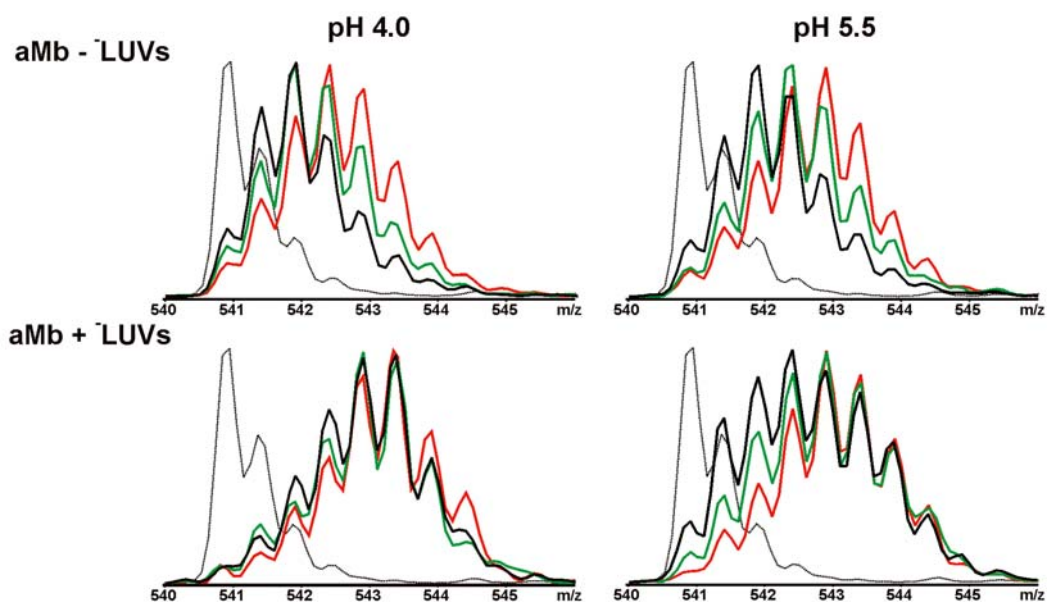


*Figure 82 : Détails des profils isotopiques obtenus pour un ion doublement chargé correspondant au peptide 8-15. Les différences entre les profils isotopiques du peptide 8-15 sont obtenues pour les cinétiques d'échange isotopique effectuées pour l'aMb en présence de LUVs anioniques (noir) et en solution (bleu) à pH 4 et pH 5,5 après 3 h, 11 h et 34 h de cinétique.*

A pH 5,5, l'évolution des profils isotopiques est la même au cours du temps pour les cinétiques effectuées sur l'aMb en solution et en présence de LUVs anioniques. Il est remarquable de noter que la diminution de la masse moyenne en présence de LUVs anioniques (Fig 82 noir) est plus la conséquence de l'élargissement du profil isotopique que celle d'un réel déplacement du profil vers des valeurs plus faibles de m/z.

Cette évolution est plus visible lorsque les profils isotopiques obtenus à différents temps sont superposés pour chaque condition (Fig. 83). Ainsi, en absence de LUVs, le déplacement des profils isotopiques vers des valeurs m/z plus faible est évident à pH 4 et pH 5,5. En présence de LUVs, à pH 4, le décalage du profil isotopique vers des valeurs de m/z est très faible ente 3 h et 35 h de cinétiques. A pH 5,5 en présence de LUVs

anioniques, on observe un élargissement du profil isotopique vers des masses plus faibles au cours du temps.



*Figure 83 : Evolution de l'enveloppe isotopique du peptide 8-15 en fonction du temps d'échange D/H : 3 h (rouge), 11 h (vert), 34 h (noir) à pH 4 et pH 5,5. Le profil isotopique du peptide complètement hydrogéné est représenté en gris.*

L'analyse des profils isotopiques (Fig. 82 et Fig. 83) permet donc de montrer l'implication d'un peptide dans l'interaction avec la bicouche lipidique.

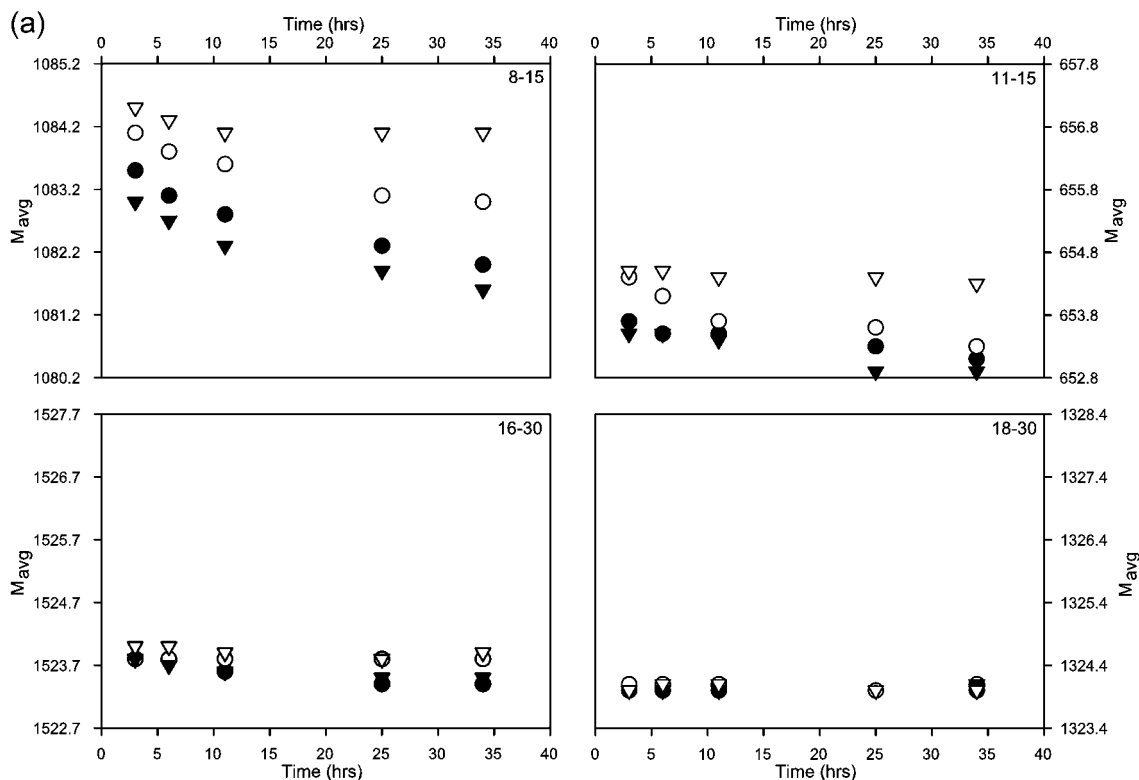
### **III.2 - Evolution de la masse moyenne de peptides après digestion enzymatique de l'aMB**

L'évolution de la masse moyenne de certains de ces peptides est montrée dans la Figure 84(a) et (b). L'analyse des peptides obtenus est réalisée en LC-MS/MS tout comme pour la cartographie de l'aMb. Les peptides sont élués sur une colonne en phase inverse (C18) puis analysés directement après séparation. Dans ce cas, l'analyse est réalisée sur un spectromètre à trappe à ions et le mode d'ionisation est l'ESI (ElectroSpray Ionization). Nous ne montrerons ici que quelques exemples de résultats qui illustrent les analyses effectuées sur tous les peptides.

La Figure 84 représente l'évolution dans le temps de la masse moyenne de peptides couvrant deux régions de l'apomyoglobine. La première est l'hélice A qui est l'hélice à l'extrémité N-terminale de la protéine et la seconde, l'hélice G qui constitue la partie la



plus hydrophobe de la protéine. La comparaison des protections contre les échanges isotopiques en présence de LUVs à pH 5,5 (cercles) et à pH 4 (triangles) donne des informations sur l'implication des peptides dans l'interaction avec la bicouche lipidique.



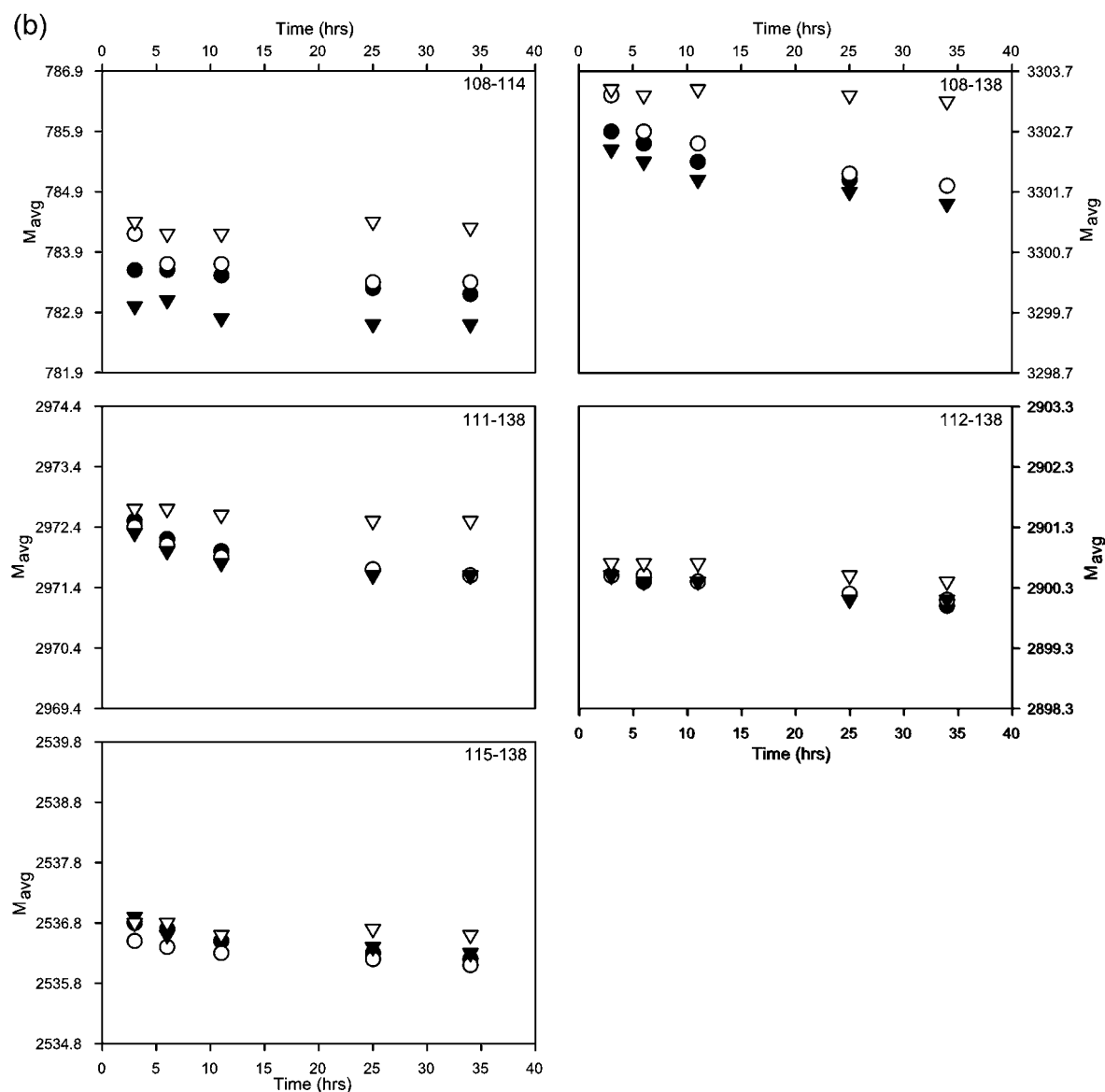
**Figure 84a : Cinétiques d'échange D/H locales pour des peptides obtenus après digestion à la pepsine ou la protéase de type XIII.** Les résultats sont ceux obtenus pour des peptides issus de la région de l'hélice A de l'aMb. Les graphiques représentent l'évolution de la masse moyenne des peptides lors de cinétiques allant de 3 h à 34 h d'échange isotopique. La numérotation en haut à droite de chaque graphique indique le premier et le dernier résidu du peptide dans la numérotation de la protéine entière. Les symboles ont la signification suivante : aMb en présence de LUVs anioniques à pH 4 (▽); aMb en solution à pH 4 (▼); aMb en présence de LUVs anioniques à pH 5.5 (○); aMb en solution à pH 5.5 (●).

L'évolution de la masse moyenne des peptides issus de l'hélice A est montrée Figure 84a. Aucune différence significative de masse n'est observée pour le peptide 16-30 par comparaison des résultats obtenus pour la protéine seule en solution et en présence de membranes, à pH 4 et pH 5,5. Le peptide 16-30 n'est donc pas impliqué dans l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique. Cela est confirmé par le résultat obtenu pour le peptide 18-30 pour lequel la présence de LUVs anioniques n'a pas d'effet sur l'échange isotopique. La région allant du résidu 16 au résidu 30 de l'aMb n'est donc pas impliquée dans une interaction directe entre aMb et bicouche lipidique à pH 5,5 et à pH 4.

Concernant la région 8-15 de l'aMb, la présence de LUVs anioniques induit une protection contre les échanges isotopiques à pH 5,5 (Fig. 84a disques) et pH 4 (Fig. 84a triangles). Cette protection contre les échanges H/D est plus importante à pH 4 qu'à pH 5,5, indiquant vraisemblablement une interaction plus étroite avec la bicouche lipidique à pH 4. Cette région de l'aMb est donc impliquée directement dans l'interaction avec les LUVs anioniques à pH 5,5 et à pH 4. Ce résultat est confirmé par l'étude du peptide chevauchant 11-15 pour lequel l'évolution de la masse moyenne en fonction du temps de la cinétique montre également à 35 h de cinétique, une protection contre les échanges H/D en présence de membranes à pH 4, mais pas à pH 5,5. En effet, la différence de masse pour l'aMb en solution et en présence de LUVs anioniques dans ce cas, n'est pas significative.

Le résultat obtenu pour le peptide 11-15 permet de mieux définir les régions de l'hélice A qui interagissent avec la bicouche lipidique. Ainsi, grâce à l'étude des peptides chevauchant 8-15 et 11-15, il est possible de conclure que la région 8-11 interagit avec la bicouche lipidique à pH 4 et pH 5,5. Cependant, le peptide 11-15 n'étant pas protégé contre les échanges isotopiques à pH 5,5, seule la région 8-11 est impliquée dans l'interaction avec la bicouche lipidique à pH 5,5. La région 16-30 couvrant la partie C-terminale de l'hélice A et une partie de l'hélice B n'est pas impliquée.

La Figure 84b montre les résultats obtenus pour la région C-terminale de la protéine (hélice G et une partie de l'hélice H, résidus 108 à 135). Le suivi de l'évolution des masses moyennes des peptides 108-114, 108-138, 111-138 montre une protection contre les échanges isotopiques à pH 4 (triangles), mais pas à pH 5,5 (cercles). Ces régions couvrant les hélices G et une partie de l'hélice H (108-138) sont donc impliquées dans l'interaction de l'aMb avec les LUVs anioniques seulement à pH 4. Cependant l'étude des peptides chevauchant 112-138 et 115-138 indique une très faible protection de ces peptides contre les échanges isotopiques à pH 4. Donc, la région 108-111 de l'aMb (située dans l'hélice G) est très protégée des échanges isotopiques à pH 4 et la région 108-115 est plus faiblement protégée. Cependant, dans ce cas, nous ne pouvons pas déterminer plus précisément l'étendue de la région interagissant faiblement avec la bicouche lipidique.



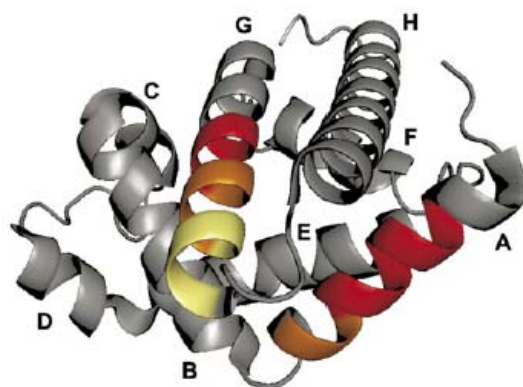
**Figure 84b : Cinétiques d'échange D/H locales pour des peptides obtenus après digestion à la pepsine ou la protéase de type XIII.** Les résultats sont ceux obtenus pour des peptides de deux régions de l'aMb impliqués dans l'interaction avec la bicouche lipidique. Les peptides issus des hélices G et H de l'aMb. Les graphiques représentent l'évolution de la masse moyenne des peptides lors de cinétiques allant de 3h à 34h d'échange isotopique. La numérotation en haut à droite de chaque graphique indique le premier et le dernier résidu du peptide dans la numérotation de la protéine entière. Les symboles ont la signification suivante : aMb en présence de LUVs anioniques à pH 4 ( $\nabla$ ); aMb en solution à pH 4 ( $\blacktriangledown$ ); aMb en présence of LUVs anioniques à pH 5.5 ( $\circ$ ); aMb en solution à pH 5.5 ( $\bullet$ ).

La caractérisation des deux états de l'aMb liée aux LUVs anioniques (pH 5,5 et pH 4) a été effectuée par échange H/D couplé à la spectrométrie de masse. Elle a également été réalisée pour la protéine en solution dans les mêmes conditions de pH. Les effets de l'interaction de l'aMb avec les LUVs anioniques ont été détectés à pH 4 et pH 5,5 (Fig. 83). Les échanges effectués en présence de LUVs anioniques sont plus lents qu'en solution. A pH 5,5, les cinétiques observées en présence de LUVs anioniques sont moins

de dix fois plus lentes que celles en solution. A pH 4, les cinétiques sont 100 fois plus lentes en présence de LUVs anioniques. Ce résultat est en bonne corrélation avec une interaction plus forte de l'aMb avec la bicouche lipidique dans ces conditions de pH. L'analyse effectuée sur les autres régions de la protéine a montré qu'elles n'étaient pas impliquées dans l'interaction de l'aMb avec les membranes.

## D – CONCLUSIONS

Les expériences de cinétique d'échanges H/D suivies de digestion enzymatique et couplées à une analyse par spectrométrie de masse electrospray ont permis de déterminer les régions de l'aMb impliquées dans l'interaction avec la bicouche lipidique à pH 4. Ces régions correspondent aux hélices A et G. (Fig. 85). A pH 5,5 il a été établi que seule l'hélice A interagit avec les membranes. A ce pH, l'aMb est dans une conformation proche de celle de l'état natif (Vernier *et al.*, 2007). L'hélice G, qui est la partie la plus hydrophobe de la protéine est donc enfouie dans le cœur hydrophobe de la protéine : elle ne peut donc pas interagir avec le bicouche lipidique. La Figure 85 montre les régions de l'aMb impliquées dans l'interaction de la protéine avec les membranes.

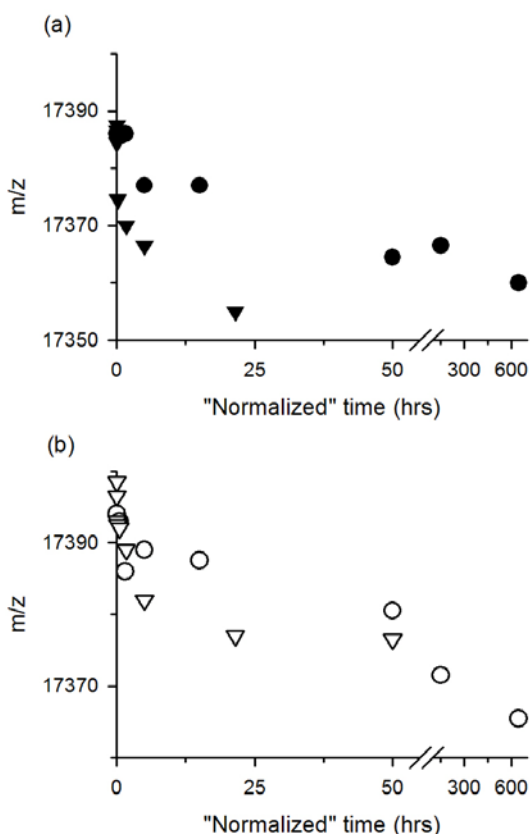


**Figure 85 : Régions de l'aMb impliquées dans l'interaction avec les membranes (PDB Id 1UFP).** Les lettres A à H représentent les huit hélices de la protéine du N-terminal vers le C-terminal. Les régions impliquées dans l'interaction de l'aMb avec les LUVs anioniques sont représentées du jaune au rouge pour des interactions faibles à fortes déterminées d'après les cinétiques locales.

Afin de confirmer l'état conformationnel de l'aMb en interaction avec les LUVs anioniques à pH 5,5, nous avons comparé les cinétiques effectuée à pH 4 et pH 5,5. Cependant la vitesse d'échange isotopique est influencée par le pH (cf.§B.2). Ainsi, la vitesse intrinsèque d'échange isotopique est environ 30 fois plus élevée à pH 5,5 qu'à pH 4. Ainsi, pour un même temps d'échange expérimental, le temps effectif d'échange à pH 5,5 est 30 fois plus élevé que celui à pH 4. Afin de prendre en compte l'effet du pH sur

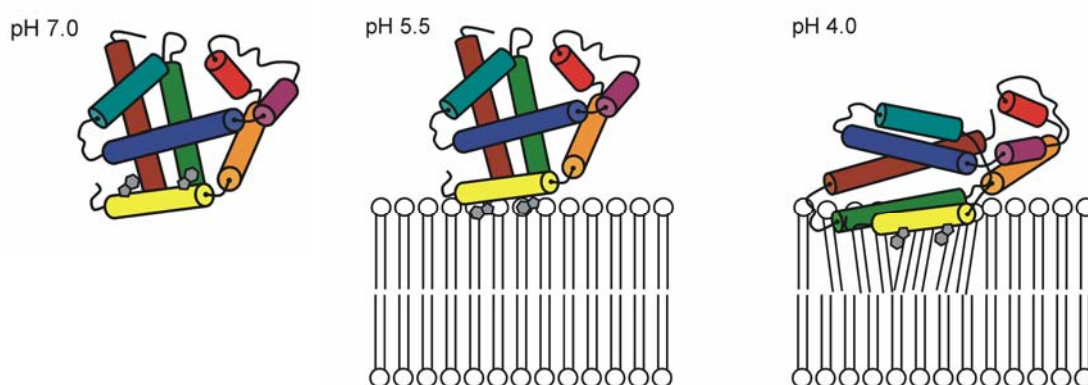
la vitesse intrinsèque d'échange, nous avons multiplié par 31,4 les temps expérimentaux des cinétiques d'échange réalisées à pH 5,5 et créé une échelle de temps normalisée (Fig. 86). Ainsi la comparaison directe des cinétiques effectuées à pH 4 et pH 5,5 est possible.

La cinétique à pH 5,5 en solution (Fig. 86a ●) est bien plus lente qu'à pH 4 (Fig. 86a ▼). Cela est dû au fait qu'en solution l'aMb est dans un état dit « molten globule » à pH 4, à pH 5,5 sa conformation très proche de celle de l'état natif protège les protons amides des échanges isotopiques. En présence de LUVs anioniques, la cinétique globale est plus lente à pH 5,5 (Fig. 86b○) qu'à pH 4 (Fig. 86b▼) alors que l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique est plus faible. D'autre part, bien que la cinétique soit plus rapide à pH 4, elle atteint un plateau plus élevé qu'à pH 5,5. Cela montre que bien que la protéine est partiellement repliée à pH 4, certains protons amides sont encore plus protégés des échanges isotopiques que lorsque la protéine est dans une conformation proche de l'état natif. Cette protection est due à l'interaction avec la bicouche lipidique.



**Figure 86 : Cinétiques globales d'échange D/H pour l'aMb en solution (a) à pH 4 (▼) et pH 5,5 (●) et en présence de LUVs anioniques (b) à pH 4 (▼) et pH 5,5 (○). Les échelles de temps ont été normalisées (le temps expérimental d'échange est multiplié par 31,4 à pH 5,5) afin de tenir compte de l'influence du pH sur les vitesses d'échanges intrinsèques.**

Il a été précédemment déterminé que l'interaction de l'aMb avec la bicouche lipidique est un processus à deux étapes dépendant du pH (Vernier *et al.*, 2007). Dans une première étape, la protéine se lie à la bicouche lipidique. Les expériences de partition suivies par centrifugation ont montré que toute la protéine est liée à la membrane à pH 5,5 (Fig. 73B). Puis avec l'acidification du pH l'insertion dans la bicouche devient plus profonde (Fig. 72 et 73A). L'aMb est alors capable de perméabiliser la bicouche lipidique (Fig. 73C). A pH 4 l'aMb est partiellement repliée en solution (Fig. 72) alors qu'en présence de LUVs anioniques les tryptophanes sont dans un environnement hydrophobe, suggérant ainsi que l'interaction de l'aMb avec les membranes nécessite la perte de sa structure tertiaire. Cependant l'étude biophysique n'a pas fourni de preuve directe de la perte de structure tertiaire de l'aMb lors de son interaction avec les membranes. Les expériences d'échange Hydrogène/Deutérium analysées par spectrométrie de masse ont permis de déterminer les régions de l'aMb en contact avec les lipides (Fig. 85). Elles ont également montré que la protéine a une conformation proche de l'état natif dans la première phase de l'interaction (pH 5,5) alors qu'elle est partiellement repliée lors de son insertion dans la bicouche lipidique (pH 4) (Fig. 86). La Figure 87 récapitule les étapes de l'interaction de l'aMb avec les membranes.



**Figure 87 :** Schéma récapitulatif de l'interaction de l'aMb avec les membranes. A pH 7, la protéine est dans sa conformation native et n'interagit pas avec la bicouche lipidique. A pH 5,5, l'aMb interagit avec les membranes via l'hélice A et conserve une conformation proche de l'état natif. A pH 4, la protéine est partiellement repliée ce qui permet à l'hélice G d'interagir avec la bicouche lipidique conjointement avec l'hélice A. Les couleurs de hélices sont les suivantes : Hélice A : jaune, Hélice B : orange, Hélice C : rouge, Hélice D : violet, Hélice E : bleu, Hélice F : bleu-vert et Hélice G : vert. Les tryptophanes de l'hélice A sont colorés en gris.

A pH 7, l'aMb est dans sa conformation native et n'interagit pas avec la bicouche lipidique. Puis à pH 5,5, la protéine dont la conformation est proche de la conformation native, se lie à la membrane par l'intermédiaire de l'hélice A (en jaune Fig. 87). Avec

l'acidification du pH, l'aMb perd sa structure tertiaire. L'hélice G (en vert Fig. 87), jusqu'alors enfouie dans le cœur hydrophobe de la protéine est alors disponible pour interagir avec les membranes. Ainsi, à pH 4, l'hélice A interagit avec la bicouche lipidique conjointement avec l'hélice G : c'est la deuxième étape de l'interaction de l'aMb. L'insertion de l'aMb dans la bicouche est alors plus profonde. Le processus de liaison aux membranes de l'aMb possède des caractéristiques communes avec celui adopté par certaines protéines amphitropiques.

Les expériences d'échange Hydrogène/Deutérium analysées par spectrométrie de masse permettent donc de déterminer les régions d'une protéine en interaction avec les membranes. Ce type d'expériences donne également des indications sur la conformation de la protéine liée à la membrane. A ce jour, nous appliquons cette méthode à l'étude du domaine de translocation de la toxine diphtérique. L'interaction de cette protéine avec la bicouche lipidique est également dépendante du pH et requiert des changements conformationnels conduisant à un état partiellement replié.





# *CONCLUSION GENERALE*



La toxine botulique est une toxine bactérienne à activité intracellulaire dont l'action peut être décomposée en quatre étapes. Elle se lie tout d'abord à son récepteur à la surface de la cellule nerveuse puis est internalisée par endocytose. Son domaine de translocation interagit ensuite avec la membrane du compartiment endosomal permettant ainsi le passage du domaine catalytique dans le cytosol où il exercera son activité. L'étude présentée dans ce manuscrit porte sur l'insertion du domaine de translocation dans les membranes. Ce dernier a été produit sous forme de protéine recombinante (Tm) à partir d'un gène de synthèse dont la séquence a été optimisée pour l'expression dans *E. coli*. Les spectres de dichroïsme circulaire enregistrés pour Tm à pH 7 en solution, ont montré que la protéine possède une structure secondaire majoritairement en hélice  $\alpha$  ainsi qu'une structure tertiaire en accord avec la structure cristallographique (Lacy *et al.*, 1998).

Les expériences de liaison aux vésicules lipidiques suivies par spectroscopie de fluorescence ont montré que la liaison de Tm à la bicouche lipidique est dépendante du pH et a lieu dès pH 5,5. L'apparition de l'état fonctionnel du domaine de translocation a été détectée par des expériences de perméabilisation de vésicules lipidiques. Ces dernières ont montré que Tm est capable de perméabiliser des vésicules lipidiques à pH acide. Ce résultat est en bonne corrélation avec l'hypothèse selon laquelle la neurotoxine botulique passerait par les endosomes dont l'acidification permettrait l'interaction du domaine de translocation avec la membrane. La perméabilisation par Tm de SUVs dont le diamètre est du même ordre de grandeur que celui des vésicules synaptiques (~50 nm) est très faible devant celle observée pour les LUVs. Il semble donc que, outre le pH, la courbure de la bicouche lipidique constitue également un niveau de régulation de l'insertion de Tm. Ainsi, par comparaison avec le trajet suivi par la toxine botulique dans la cellule, on peut raisonnablement supposer que cette dernière n'est pas « fonctionnelle » dans les vésicules synaptiques même lorsque leur pH est acidifié lors de l'étape d'accumulation de neurotransmetteur. Le domaine de translocation de la toxine botulique pourrait alors s'insérer seulement dans la membrane de l'endosome à pH acide.

La toxine entre dans la cellule nerveuse par les vésicules synaptiques conduisant à leur recyclage. Une des voies possibles du recyclage de ces dernières est le passage par les endosomes où les conditions de pH et de courbure de la membrane sont favorables à l'insertion du domaine de translocation.

Les spectres de dichroïsme circulaire enregistrés lorsque Tm est en présence de LUVs anioniques à pH acide ne montrent pas de changements de structure secondaire et tertiaire. Ainsi, la protéine ne passe pas par un état partiellement replié pour interagir avec

la bicouche lipidique comme c'est le cas pour d'autres toxines. Il reste néanmoins probable que Tm subisse des changements de structure quaternaire lors de son insertion dans les membranes ; ces derniers n'étant pas détectés par cette technique spectroscopique. Les résultats préliminaires des expériences de pontage au glutaraldéhyde vont dans le sens d'une oligomérisation de Tm. Il semble donc que l'interaction de Tm avec les membranes passe par une oligomérisation et non par un état partiellement replié comme c'est le cas du domaine de translocation de la toxine diphtérique. L'oligomérisation doit cependant être mieux caractérisée. De nouvelles expériences de pontage utilisant d'autres agents pontants sont prévues ainsi que des expériences de chromatographie d'exclusion. Enfin, la cristallisation de Tm inséré dans la bicouche lipidique est également envisagée. Cette dernière est possible dans ce cas, car la protéine conserve sa structure tertiaire lorsqu'elle interagit avec la bicouche lipidique. L'optimisation des protocoles de purification et l'étude de la stabilité de la protéine à pH acide sont en cours dans ce but.

La structure des protéines amphitropiques est très souvent finement caractérisée en solution contrairement à celle de l'état lié à la membrane. La difficulté réside essentiellement dans l'état partiellement replié qu'adoptent nombre de ces protéines lors de leur interaction avec la bicouche lipidique. La mise au point d'une méthode d'analyse d'expériences d'échange Hydrogène/Deutérium par spectrométrie de masse nous a permis de déterminer les régions de l'apomyoglobine en interaction avec les lipides. De plus, ce type d'expériences donne des indications sur la conformation de la protéine liée à la membrane.

L'apomyoglobine appartient à la famille des protéines à repliement de type globine dont font également partie les membres de la famille de Bcl-2, les domaines de formation de pores des colicines, et chez certaines toxines bactériennes comme le domaine de translocation de la toxine diphtérique par exemple.

L'interaction de l'apomyoglobine avec la bicouche lipidique est un processus à deux étapes dépendant du pH qui présente des caractéristiques communes avec celui observé pour d'autres protéines de la même famille, dont certains domaines de toxines bactériennes. Dans un premier temps, la protéine se lie à la bicouche lipidique (pH 5,5), puis avec l'acidification du pH, elle s'insère plus profondément (pH 4). Les expériences d'échange H/D ont été menées sur l'aMb en interaction avec des LUVs anioniques à pH 5,5 et pH 4. L'analyse par spectrométrie de masse a montré que seule l'hélice amphiphile A est en contact avec les lipides dans la première phase de l'interaction de

l'aMb avec la bicouche lipidique (pH 5,5). Elle a également permis de déterminer que lors de sa liaison à la membrane l'aMb possède une conformation très proche de l'état natif. A pH 4, lorsque la protéine est plus profondément insérée dans la bicouche lipidique, l'aMb est dans un état partiellement replié et n'a plus de structure tertiaire stable. L'interaction de l'aMb se fait alors *via* l'hélice A et l'hélice G. L'hélice G est hydrophobe et ne devient disponible pour l'interaction avec la bicouche lipidique que lorsque la protéine a perdu sa structure tertiaire.

L'analyse d'échange H/D par spectrométrie de masse semble donc être une méthode prometteuse pour la localisation de régions de protéines en interaction avec la bicouche lipidique ainsi que la détermination de la conformation de l'état lié à la membrane. Cette méthode présente de nombreux avantages. Elle n'impose pas de limite de masse moléculaire des protéines, ne nécessite pas la présence d'une structure tertiaire stable et est donc applicable à des protéines partiellement repliées et sa mise en œuvre en est relativement aisée. Cette méthode pourra donc vraisemblablement être facilement appliquée à un grand nombre de protéines. Nous sommes actuellement en train de l'appliquer au domaine de translocation de la toxine diphtérique dont l'interaction avec la bicouche est plus étroite que celle de l'aMb.



# *ANNEXES*





ANNEXE 1

|             |  |   |     |     |     |    |
|-------------|--|---|-----|-----|-----|----|
|             | 10   | 20                                      | 30  | 40  | 50  |    |
| 60          | ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../ |   |     |     |     |    |
| Tl natif    | ~~~~~aattttactggattgtttgaattttataagttgctatgtgtaagagggataat                     |   |     |     |     |    |
| 53          |  |   |     |     |     |    |
|             |  | N F T G L F E F Y K L L C V R G I I     |     |     |     |    |
| Tl optimisé | GCATGCCAACTTTACCGCCTGTTTCGAATTCATAAACTGCTGTGTGTTTCGTGGCATTAT                   |   |     |     |     |    |
| 60          |  |   |     |     |     |    |
|             | 70   | 80                                      | 90  | 100 | 110 | Tm |
| 120         | ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../       |   |     |     |     | ↑  |
| Tl natif    | aacttctaaaactaaatcattagataaaggatacaataaggcattaaatgatttatgtat                   |   |     |     |     |    |
| 113         |  |   |     |     |     |    |
|             |  | T S K T K S L D K G Y N K A L N D L C I |     |     |     |    |
| Tl optimisé | CACCAGCAAACCAAAGCCTGGATAAAGGCTACAACAAAGCGCTGAACGATCTGTGTAT                     |   |     |     |     |    |
| 120         |  |   |     |     |     |    |
|             | 130  | 140                                     | 150 | 160 | 170 |    |
| 180         | ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../       |   |     |     |     |    |
| Tl natif    | caaagttaataattgggacttgtttttagtccttcagaagataattttactaatgatct                    |   |     |     |     |    |
| 173         |  |   |     |     |     |    |
|             |  | K V N N W D L F F S P S E D N F T N D L |     |     |     |    |
| Tl optimisé | CAAAGTGAACAACCTGGGACCTGTTTTTTAGCCCGAGCGAAGATAACTTTACCAACGATCT                  |   |     |     |     |    |
| 180         |  |   |     |     |     |    |
|             | 190  | 200                                     | 210 | 220 | 230 |    |
| 240         | ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../       |   |     |     |     |    |
| Tl natif    | aaataaaggagaagaaattacatctgataactaatatagaagcagcagaagaaaatattag                  |   |     |     |     |    |
| 233         |  |   |     |     |     |    |
|             |  | N K G E E I T S D T N I E A A E E N I S |     |     |     |    |
| Tl optimisé | GAATAAAGGCGAAGAAATCACCAGCGATACCAACATTGAAGCGGCGGAAGAAAACATTAG                   |   |     |     |     |    |
| 240         |  |   |     |     |     |    |
|             | 250  | 260                                     | 270 | 280 | 290 |    |
| 300         | ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../       |   |     |     |     |    |
| Tl natif    | tttagatttaatacaacaatattatttaacctttaattttgataatgaacctgaaaatat                   |   |     |     |     |    |
| 293         |  |   |     |     |     |    |
|             |  | L D L I Q Q Y Y L T F N F D N E P E N I |     |     |     |    |
| Tl optimisé | CCTGGATCTGATCCAGCAGTATTATCTGACCTTTAACTTCGATAACGAACCGAAAACAT                    |   |     |     |     |    |
| 300         |  |   |     |     |     |    |
|             | 310  | 320                                     | 330 | 340 | 350 |    |
| 360         | ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../       |   |     |     |     |    |
| Tl natif    | ttcaatagaaaatctttcaagtgcattataggccaattagaacttatgcctaatataga                    |   |     |     |     |    |
| 353         |  |   |     |     |     |    |
|             |  | S I E N L S S D I I G Q L E L M P N I E |     |     |     |    |
| Tl optimisé | CAGCATCGAAAACCTGAGCAGCGATATTATTGGCCAGCTGGAACCTGATGCCGAACATTGA                  |   |     |     |     |    |
| 360         |  |   |     |     |     |    |
|             | 370  | 380                                     | 390 | 400 | 410 | Ts |
| 420         | ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../       |   |     |     |     | ↑  |
| 200         |  |   |     |     |     |    |

Annexes

Tl natif 413 aagatttcctaataaggaaaaagtatgagttagataaataactatggtccattatcttcg  
R F P N G K K Y E L D K Y T M F H Y L R  
Tl optimisé 420 ACGTTTTCCGAACGGCAAAAAATATGAACTGGATAAATACACCATGTTCCACTATCTGCG  
430 440 450 460 470  
480 ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
Tl natif 473 tgctcaagaatttgaacatggtaaacttaggattgctttaacaaattctgttaacgaagc  
A Q E F E H G K S R I A L T N S V N E A  
Tl optimisé 480 TGCCCAGGAATTTGAACACGGCAAAAGCCGTATTGCCCTGACCAACAGCGTTAATGAAGC  
490 500 510 520 530  
540 ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
Tl natif 533 attattaaatcctagtcgtgtttatacatttttttcttcagactatgtaaagaaagttaa  
L L N P S R V Y T F F S S D Y V K K V N  
Tl optimisé 540 GCTGCTGAATCCGAGCCGTGTGTATACCTTTTTTCAGCAGCGATTATGTGAAAAAAGTGAA  
550 560 570 580 590  
600 ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
Tl natif 593 taaagcGACCGAAGCGcgtatgttttttaggctgggtagaacaattagtatatgattttac  
K A T E A A M F L G W V E Q L V Y D F T  
Tl optimisé 600 CAAAGCGACCGAAGCGCGATGTTTCTGGGTGGGTGGAACAGCTGGTGTATGATTTCCAC  
610 620 630 640 650  
660 ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
Tl natif 653 cgatgaaactagcgaagtaagtactacggataaaaattgcggatataactataattattcc  
D E T S E V S T T D K I A D I T I I I P  
Tl optimisé 660 CGATGAAACCAGCGAAGTTAGCACCACCGATAAAAATCGCCGATATCACCATCATCATCCC  
670 680 690 700 710  
720 ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
Tl natif 713 atatataggacctgctttaaatataggtaaatatgttatataaagatgattttgtaggtgc  
Y I G P A L N I G N M L Y K D D F V G A  
Tl optimisé 720 GTATATTGGTCCGGCGCTGAACATTGGCAACATGCTGTATAAAGATGATTTTGTGGGCGC  
730 740 750 760 770  
780 ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
Tl natif 773 ttttaaatattttcaggagctgttattctgttagaatttataaccagagattgcaataacctgt  
L I F S G A V I L L E F I P E I A I P V  
Tl optimisé 780 CCTGATTTTTAGCGGTGCCGTGATCCTGCTGGAATTTATTCCGGAATCGCCATTCCGGT

Annexes

790 800 810 820 830  
840  
Tl natif ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
833 attaggtacttttgcacttgtatcatatattgcaataagggttctaaccggttcaacaat  
L G T F A L V S Y I A N K V L T V Q T I  
Tl optimisé TCTGGGCACCTTTGCCCTGGTTAGCTACATTGCCAACAAAGTGCTGACCGTTCAGACCAT  
840

850 860 870 880 890  
900  
Tl natif ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
893 agataatgctttaagtaaaagaaatgaaaaatgggatgaggtctataaatatagtaac  
D N A L S K R N E K W D E V Y K Y I V T  
Tl optimisé TGATAACGCCCTGAGCAAACGTAACGAAAAATGGGATGAGGTGTACAAATACATCGTTAC  
900

910 920 930 940 950  
960  
Tl natif ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
953 aaattggttagcaaaggtaatacacagattgatctaataagaaaaaaatgaaagaagc  
N W L A K V N T Q I D L I R K K M K E A  
Tl optimisé CAACTGGCTGGCGAAAGTGAACACCCAGATTGATCTGATCCGTAAAAAATGAAAGAAGC  
960

970 980 990 1000 1010  
1020  
Tl natif ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
1013 tttagaaaatcaagcagaagcaacaaaggctataataaactatcagtataatcaatatac  
L E N Q A E A T K A I I N Y Q Y N Q Y T  
Tl optimisé GCTGGAAAATCAGGCGGAAGCGACCAAAGCGATCATCAACTATCAGTACAACCAGTACAC  
1020

1030 1040 1050 1060 1070  
1080  
Tl natif ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
1073 tgaggaagagaaaaataatattaattttaatattgatgatttaagttcgaacttaatga  
E E E K N N I N F N I D D L S S K L N E  
Tl optimisé CGAAGAAGAAAAACAACATCAACTTCAACATCGATGATCTGAGCAGCAAACCTGAACGA  
1080

1090 1100 1110 1120 1130  
1140  
Tl natif ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
1133 gtctataaataaagctatgattaatataaataaatttttgaatcaatCTtctgtttcata  
S I N K A M I N I N K F L N Q S S V S Y  
Tl optimisé AAGCATCAACAAAGCGATGATTAACATCAACAAATTTCTGAACCAGAGCAGCGTGAGCTA  
1140

1150 1160 1170 1180 1190  
1200  
Tl natif ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../  
1193 tttaatgaattctatgatcccttatgggtgtaaacgggttagaagattttgatgctagtct  
L M N S M I P Y G V K R L E D F D A S L

*Annexes*

---

```

Tl optimisé TCTGATGAACAGCATGATTCCGTATGGCGTGAAACGCCCTGGAAGATTTTGATGCCAGCCT
1200

          1210      1220      1230      1240      1250
1260
          ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../
Tl natif    taaagatgcattattaaagtatatatatagataatagaggaactttaattgggtcaagtaga
1253
          K D A L L K Y I Y D N R G T L I G Q V D
Tl optimisé GAAAGATGCCCTGCTGAAATACATCTACGATAACCGTGGCACCCCTGATTGGTCAGGTGGA
1260

          1270      1280      1290      1300      1310
1320
          ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../
Tl natif    tagattaaagataaagttaataatacacttagtacagatataccttttcagctttccaa
1313
          R L K D K V N N T L S T D I P F Q L S K
Tl optimisé TCGCCTGAAAGATAAAGTTAACAACACCCCTGAGCACCGATATCCCGTTTCAGCTGAGCAA
1320

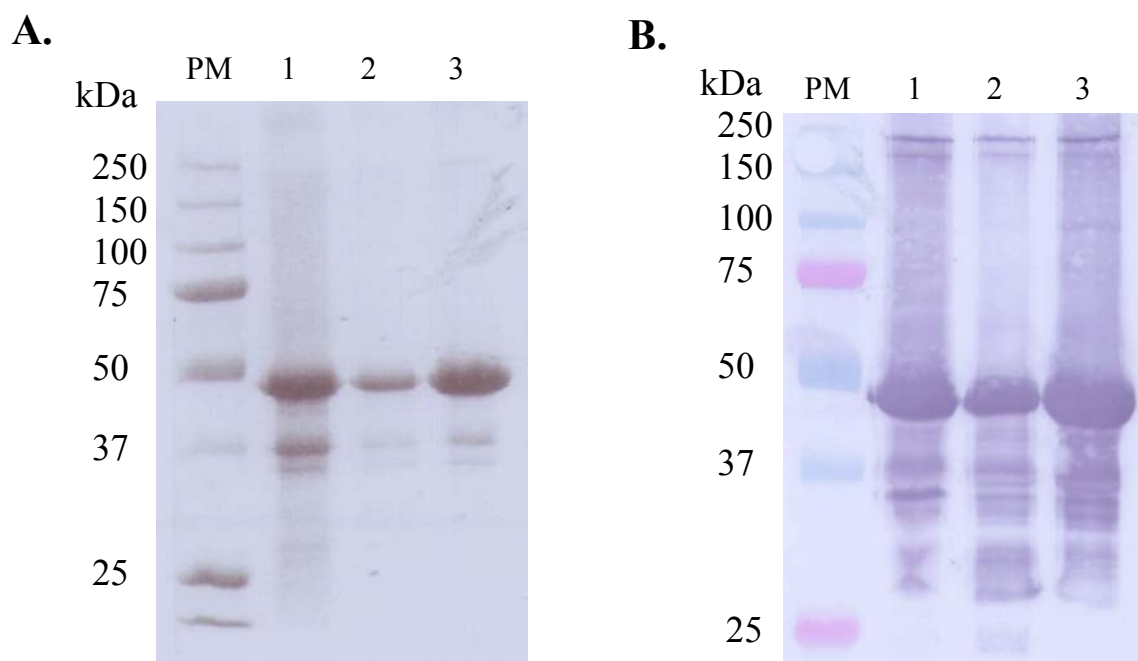
          1330      1340      1350      1360      1370
1380
          ...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../...../
Tl natif    atacgtagataatcaaagattattatctacatttactgaatatattaagaatattattaa
1373
          Y V D N Q R L L S T F T E Y I K N I I N
Tl optimisé ATATGTGGATAACCAGCGTCTGCTGAGCACCTTTACCGAATACATCAAAAACATCATCAA
1380

          1390
          ...../...../...../.
Tl natif    tacttcttaa      1383
          T S *      X
Tl optimisé CACCAGCTAACTGCAG 1396
    
```

**Annexe 1 : Alignement de la séquence native du domaine de translocation Tl de BoNT/A et de la séquence du gène de synthèse optimisé pour l'expression chez *E. coli*.**

La séquence native du domaine de translocation Tl est en minuscule, celle du gène de synthèse est en majuscule. Le vert correspond à une adénine, le rouge une thymine, le noir une guanine et le bleu une cytosine. Les bases identiques entre les deux séquences sont surlignées. La séquence codante en acides aminés est représentée entre les deux séquences d'ADN. Les cadres noirs représentent les mutations incorporées dans la séquence native (en majuscules) avant optimisation, la séquence Shine-Dalgarno (gctacggaggca/gcGACCGAAGCG) et la cystéine 791 mutée en sérine. Les flèches indiquent les positions des deux autres constructions Tm et Ts du domaine de translocation.

ANNEXE 2



**Annexe 2 : Purification du domaine Tm par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel**

**A.** Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% coloré au bleu de Coomassie.

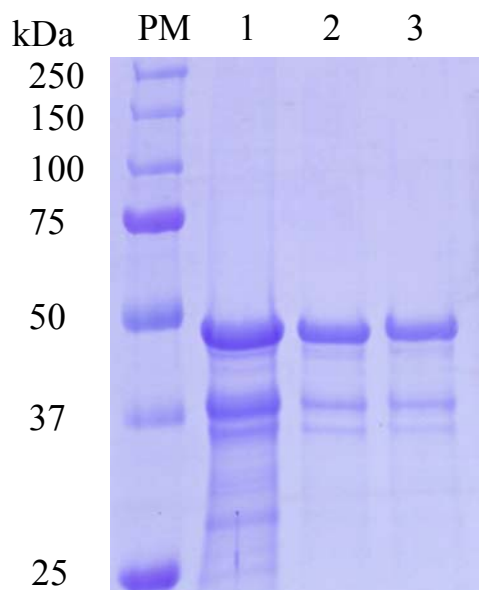
**B.** Immunodétection après électro-transfert sur membrane avec un Anticorps anti-poly-histidine.

1. Fraction 10 mM d'imidazole
2. Fraction 50 mM d'imidazole
3. Fraction 500 mM d'imidazole

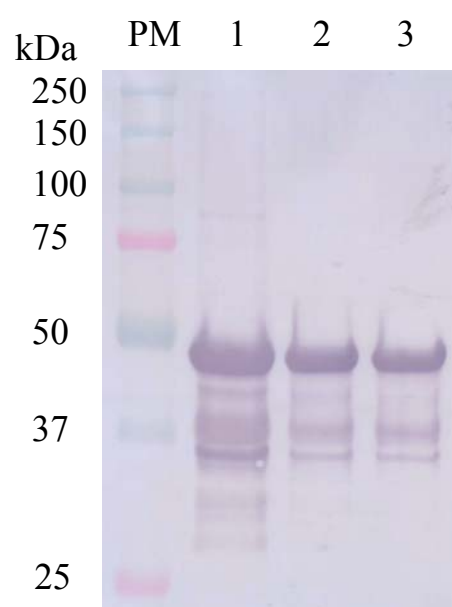


ANNEXE 3

A.



B.



**Annexe 3 : Purification de la protéine Tm : étapes :**

**A.** Electrophorèse sur gel de polyacrylamide 10% coloré au bleu de Coomassie.

**B.** Immunodétection après électrotransfert sur membrane avec un anticorps anti-poyl- histidine.

**1 :** Dialyse après chromatographie d'affinité

**2 :** Chromatographie d'exclusion S100

**3 :** Dessalage des protéines sur colonne G25 SF





*PUBLICATIONS*

## Behavior of the N-Terminal Helices of the Diphtheria Toxin T Domain during the Successive Steps of Membrane Interaction<sup>†</sup>

Caroline Montagner,<sup>‡,§</sup> Aurélie Perier,<sup>||,§</sup> Sylvain Pichard,<sup>||</sup> Grégory Vernier,<sup>‡</sup> André Ménez,<sup>||</sup> Daniel Gillet,<sup>\*,||</sup> Vincent Forge,<sup>\*,‡</sup> and Alexandre Chenal<sup>\*,||,‡</sup>

CEA, DSV, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5090, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France, and CEA, DSV, Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, 91191 Gif sur Yvette cedex, France

Received November 16, 2006; Revised Manuscript Received December 18, 2006

**ABSTRACT:** During intoxication of a cell, the translocation (T) domain of the diphtheria toxin helps the passage of the catalytic domain across the membrane of the endosome into the cytoplasm. We have investigated the behavior of the N-terminal region of the T domain during the successive steps of its interaction with membranes at acidic pH using tryptophan fluorescence, its quenching by brominated lipids, and trypsin digestion. The change in the environment of this region was monitored using mutant W281F carrying a single native tryptophan at position 206 at the tip of helix TH1. The intrinsic propensity to interact with the membrane of each helix of the N-terminus of the T domain, TH1, TH2, TH3, and TH4, was also studied using synthetic peptides. We showed the N-terminal region of the T domain was not involved in the binding of the domain to the membrane, which occurred at pH 6 mainly through hydrophobic effects. At that stage of the interaction, the N-terminal region remained strongly solvated. Further acidification eliminated repulsive electrostatic interactions between this region and the membrane, allowing its penetration into the membrane by attractive electrostatic interactions and hydrophobic effects. The peptide study indicated the nature of forces contributing to membrane penetration. Overall, the data suggested that the acidic pH found in the endosome not only triggers the formation of the molten globule state of the T domain required for membrane interaction but also governs a progressive penetration of the N-terminal part of the T domain in the membrane. We propose that these physicochemical properties are necessary for the translocation of the catalytic domain.

Amphitropic proteins are proteins evolving between a soluble state and membrane-bound states to achieve their function (1, 2). They are implicated in many key biological processes, such as apoptosis (3), gluconeogenesis (4), neuronal maturation (5), transport of hydrophobic molecules (6), chaperoning of proteins and lipid membranes (7), membrane dynamics (8), lipid homeostasis (9), endocytosis (10), cell signaling (11), cell division (12), DNA replication (13), and

bacterial virulence (14). Understanding the physicochemical properties supporting the amphitropic behavior of these proteins is essential to understanding their mechanism of action, exploiting their properties for biotechnological applications, and modulating their function for therapy. In some cases, membrane insertion of these proteins was found to be related to hydrophobic effects and to a balance of electrostatic attractions and repulsions between charged residues of proteins and phospholipids (4, 9, 15–17).

Bacterial toxins of the AB<sub>RT</sub> type (18), of which diphtheria toxin is one, act by injecting inside the cytoplasm of intoxicated cells a toxic, catalytic domain. This involves the participation of a translocation (T) domain, which has the characteristics of an amphitropic protein. The membrane insertion mechanism of the diphtheria toxin T domain<sup>1</sup> is one of the most documented among bacterial toxins (19). This T domain is composed of 10  $\alpha$ -helices named TH1–TH9 and TH5', organized in a globular shape (20) (Figure 1). The hydrophobic helices TH8 and TH9 (Figure 1, colored red) are sandwiched by two layers of amphiphilic helices,

<sup>†</sup>This work was supported by the Commissariat à l'Energie Atomique (Grant "Signalization and membrane transport"), the CNRS, and Grant ACI Microbiologie MIC0325 from FNS.

\* To whom correspondence should be addressed. D.G.: Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines, CEA-Saclay, 91191 Gif sur Yvette cedex, France; telephone, (33) 1 69 08 76 46; fax, (33) 1 69 08 94 30; e-mail, daniel.gillet@cea.fr. V.F.: Biophysique Moléculaire et Cellulaire, UMR 5090, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France; telephone, (33) 4 38 78 94 05; fax, (33) 4 38 78 54 87; e-mail, vincent.forge@cea.fr. A.C.: unité de Biochimie des Interactions Macromoléculaires, URA 2185, Département de Biologie Structurale et Chimie, Institut Pasteur, 25-28, rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France; telephone, (33) 1 44 38 92 12; fax, (33) 1 40 61 30 42; e-mail, chenalex@pasteur.fr.

<sup>‡</sup>CEA, DSV, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, Biophysique Moléculaire et Cellulaire.

<sup>§</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>||</sup>CEA, DSV, Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines.

<sup>†</sup>Present address: Unité de Biochimie des Interactions Macromoléculaires, URA 2185, Département de Biologie Structurale et Chimie, Institut Pasteur, 25-28, rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

<sup>1</sup>Abbreviations: (6-7BR)-PC, 1-palmitoyl-2-stearoyl(6-7)dibromostearoyl-glycero-3-phosphocholine; CD, circular dichroism; EPA, egg phosphatidic acid; EPC, egg phosphatidylcholine;  $\lambda_{max}$ , maximum emission wavelength; L:P, lipid:protein molar ratio; LUVs, large unilamellar vesicles; rFI, ratio of fluorescence intensity; T domain, translocation domain; SUVs, small unilamellar vesicles; WT, wild type.

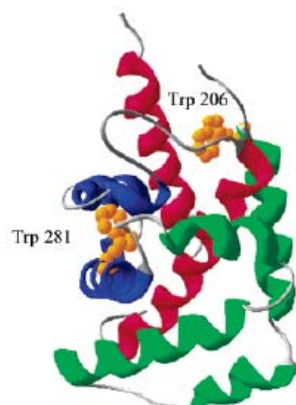


FIGURE 1: Structure, and sequences of the diphtheria toxin T domain and peptides TH1–TH4 used in this study. The structure of the T domain was from PDB entry 1F0L. Helices TH1–TH4 are colored green, TH5–TH7 blue, and TH8 and TH9 red. Trp 206 and Trp 281 are colored orange. Helices are shown in bold in the amino acid sequences. Trp residues used as fluorescent probes in the peptides are underlined. Only TH1 contains a native Trp.

TH1–TH4 (colored green) and TH5–TH7 (colored blue). During cell intoxication, the toxin is internalized into the cell endosomes. The T domain undergoes a conformational change triggered by the acidic pH found in these compartments (19). This triggers the penetration of T into the membrane, initiating the translocation of the catalytic domain into the cytosol (19). Then, the extraction of the catalytic domain from the trans side of the endosomal membrane and its release in the cytosol involve the help of cell proteins (21–27).

We showed previously that the T domain penetrates the membrane via a two-step process as the pH decreases (28). The protonation of several residues of the T domain destabilizes its native state, leading to the accumulation of a partially folded, molten globule state, prone to interact with membranes (28, 29). During the first step, the solvent-exposed hydrophobic surfaces of the molten globule state allow binding to the membrane (28–33). This involves mainly hydrophobic effects. During the second step triggered by further acidification, a reorganization of the membrane-bound state of the T domain leads to a deeper insertion (28–37). This membrane-inserted state permeabilizes the membrane (28, 35). This step involves electrostatic interactions between the T domain and anionic membranes (28).

We hypothesized that the second step of membrane penetration involves in particular the N-terminal helices of the T domain (28). We proposed that these helices shifted progressively from a position exposed to the solvent to one deeply buried within the interface of the membrane. We also proposed that this phenomenon was connected with the protonation of acidic amino acid side chains carried by these helices. The goal of this work was to test these hypotheses. A better understanding of the interaction between the N-terminal part of the T domain and the lipid bilayer is essential to describing the function of the T domain and its regulation by the pH which is required for the translocation of the catalytic domain across the endosomal membrane.

For this purpose, we produced a mutant of the T domain (W281F) carrying a single native Trp at position 206 within helix TH1 (27). This Trp was used as a fluorescent probe to monitor the environment of the N-terminus of T during binding to the membrane of phospholipid bilayers. To further

#### Sequence of the T-domain :

```
INLDWDVIRDKTKTKIESLKEHGPIKNKMSESPNKTV
SEEKAKQYLEEFHQTALEHPELSELKTVTGTNPVFA
GANYAAWAVNVAQVIDSETADNLEKTTAALSILPGI
GSVMGIADGAVHHNTEEVAQSIALSSLMVAQAIPLVG
ELVDIGFAAYNFVESIINLFGVVHNSYNRPAYSPGHKTHA
```

#### Sequences of the peptides :

```
TH1: NLDWDVIRDKTKTKIESLKEHG
TH2: GPIKNKMSESWN
TH3: TVSEEKAKQWLEEFHQTALE
TH4: HPELSELKTVTGTNW
```

characterize the membrane insertion process of this region, we carried out tryptophan quenching experiments using membranes containing brominated phospholipids. We also performed trypsin digestions of the membrane-inserted state of the T domain. Finally, we used four synthetic peptides corresponding to the sequence of helices TH1–TH4 composing the N-terminal region of the T domain. The results allowed the description of the successive steps followed by the N-terminal region of the T domain during its membrane insertion process. They showed also the physicochemical properties of the different helices forming this region and the nature of the interactions that are involved.

#### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** All reagents used were of the highest purity. Fmoc-protected amino acids, Rink Amide Resin, and HBTU were purchased from Novabiochem (France Biochem, Meudon, France). The lipids, egg phosphatidylcholine (EPC, reference 830051), egg phosphatidic acid (EPA, reference 830101), and the brominated lipids (6-7BR)-PC [16:0–18:0(6-7BR)-PC, 1-palmitoyl-2-stearoyl(6–7)dibromo-*sn*-glycero-3-phosphocholine, reference 850480C] and (9-10BR)-PC [16:0–18:0(9-10BR)-PC, 1-palmitoyl-2-stearoyl(9–10)dibromo-*sn*-glycero-3-phosphocholine, reference 850481C] were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Trypsin (formally TPCK-treated trypsin, reference T-1426) and AEBSF were from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

**Recombinant Proteins.** The production of the recombinant T domain containing the C201S mutation (native diphtheria toxin numbering) and termed WT has been described previously (28). The W281F mutation was introduced by site-directed mutagenesis and the sequence checked by DNA sequencing. Purification of the recombinant proteins has been described previously (28). Briefly, after extraction, the soluble fraction of proteins was subjected to immobilized nickel affinity chromatography, size exclusion chromatography, and ion exchange chromatography. The purification buffer was finally exchanged with  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  on a G25SF column, prior to lyophilization. The proteins were analyzed by SDS–PAGE, Western blot analysis, N-terminal protein sequencing, and electrospray mass spectrometry. The lyophi-

lized wild-type (WT) T domain and its W281F mutant were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The molar  $\epsilon$  values were 18 200 and 12 200  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  for the WT and W281F T domains, respectively.

**Peptides.** The TH1 peptide was synthesized and purified by NeoMPS (Strasbourg, France). Peptides TH2, TH3, and TH4 were synthesized on an Advanced ChemTech 357 MPS synthesizer (Advanced Chemtech Europe, Brussels, Belgium) according to the Fmoc strategy. Peptides (N-acetylated) were deprotected and cleaved from the resin by treatment with 95% trifluoroacetic acid, 2.5% triisopropylsilane, and 2.5% distilled water. They were purified to homogeneity by reversed phase HPLC on a C18 Vydac column using an acetonitrile/trifluoroacetic acid gradient. Their quality was assessed by electrospray mass spectrometry and N-terminal sequencing. The sequences of the peptides are as follows: TH1, NLDWDVIRDKTKTKIESLKEHG; TH2, GPIKNK-MSESWN; TH3, TVSEKAKQWLEEFHQTALE; and TH4, HPELSELKTVTGTINW. The molecular masses (MM) are 2625, 1390, 2403, and 1712 Da, respectively, and the pK values are 7.7, 8.6, 4.7, and 5.4, respectively; the molar  $\epsilon$  at 280 nm ( $E_M$ ) is 5500  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  for all peptides. Only the Trp in the sequence of the TH1 peptide is native; the other Trp residues were introduced into the peptide sequences as spectroscopic probes.

**Lipid Vesicles.** Vesicle suspensions of anionic lipid bilayers at a lipid concentration of 10 mM were prepared in 10 mM sodium citrate/citrate buffer (pH 7) with EPC and EPA at a 9:1 molar ratio by reverse phase evaporation and filtration for large unilamellar vesicles (LUVs) and by sonication for small unilamellar vesicles (SUVs). In the presence of brominated lipids, the EPC:BR-PC:EPA ratio was 5:4:1; the LUVs and SUVs were prepared as described above but at  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Preparation of Samples.** The proteins were diluted in 5 mM citrate buffer at the indicated pH. The peptides were diluted in 10 mM citrate buffer for fluorescence experiments and 4 mM citrate buffer for circular dichroism experiments. In partitioning experiments, proteins or peptides and anionic SUVs or LUVs were mixed at L:P molar ratios ranging from 0 to 1000 and incubated for 2 h at  $22^{\circ}\text{C}$ . To study the interaction of proteins or peptides with membranes as a function of pH, proteins and LUVs were mixed at an L:P of 500 and peptides and SUV were mixed at an L:P of 1000. Samples were incubated for 2 h at  $22^{\circ}\text{C}$  and 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$  when brominated lipids were used, before experiments. pH values were always measured afterward. A stock solution of 5 M NaCl was used for experiments performed in the presence of 200 mM NaCl.

**CD Spectropolarimetry.** For proteins, CD experiments were performed on a CD6 spectrodichrograph (Jobin-Yvon Instruments, Longjumeau, France) as described previously (29). The scans were recorded using a bandwidth of 2 nm and an integration time of 1 s at a scan rate of 0.5 nm/s. Each spectrum is the average of 20 scans and 10 scans for near-UV and far-UV measurements, respectively. Protein concentrations were 20 and 5  $\mu\text{M}$  for near-UV and far-UV measurements, respectively. The spectra were corrected for the blank, and a smoothing algorithm was used with the minimum filter in the CD6 software (CDMax, filter 5).

For peptides, CD experiments were performed on a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) with a 1 mm path length quartz cell, using a bandwidth of 4 nm, an integration

time of 1 s, and a scan rate of 0.8 nm/s. Each spectrum is the average of 40 scans. The peptide concentration was 20  $\mu\text{M}$ .

**Fluorescence Spectroscopy.** For proteins, measurements were performed with an FP-750 spectrofluorimeter (Jasco) in a thermostated cell holder, using a 1 cm path length quartz cell, as described previously (29). A bandwidth of 5 nm was used for both excitation and emission beams. The excitation wavelength was fixed at 292 nm. The emission spectra were recorded from 300 to 400 nm at a scan rate of 125 nm/min. The maximum emission wavelength ( $\lambda_{\text{max}}$ ) and fluorescence intensity ratios at 360 nm to 320 nm (rFI 360/320) represent the average of three values obtained from emission spectra that were corrected for blank measurements. The protein concentration was 1  $\mu\text{M}$ .

For peptides, measurements were taken using a Jasco FP-6500 spectrofluorimeter using a 1 cm path length quartz cell. The bandwidth was 5 nm for both excitation and emission beams. The excitation wavelength was fixed at 280 nm, and emission spectra were recorded from 300 to 400 nm at a scan rate of 100 nm/min.  $\lambda_{\text{max}}$  represents the average of three values obtained from emission spectra corrected for blank measurements. The peptide concentration was 2  $\mu\text{M}$ .

With regard to the experiments performed in the presence of brominated lipids, the fluorimeter was thermostated at  $37^{\circ}\text{C}$ . The experiments were carried out on a photon technology international QM-4/2005 SE spectrofluorimeter using a 1 cm path length quartz cell, at  $37^{\circ}\text{C}$ . A bandwidth of 5 nm was used for both excitation and emission beams. The excitation wavelength was fixed at 292 nm, and emission spectra were recorded from 300 to 400 nm.

**Binding of Proteins to LUVs Studied by Centrifugation.** LUVs and proteins were incubated for 2 h at  $22^{\circ}\text{C}$  in 4 mL of 5 mM citrate buffer. After fluorescence measurements, each sample was centrifuged in an L-70 ultracentrifuge (Beckman, Roissy, France) using a Ti 70.1 rotor at 60 000 rpm for 20 min at  $22^{\circ}\text{C}$ . The fraction of bound proteins was determined as  $(F_0 - F)/F_0$ , where  $F_0$  is the fluorescence intensity of the sample before centrifugation and in the absence of LUVs (i.e., before the addition of LUVs) and  $F$  is the intensity of the supernatant after centrifugation in the presence of LUVs.

**Proteolytic Cleavage Experiments.** The T domain (10  $\mu\text{M}$ ) was incubated in the absence or presence of LUV at an L:P of 500 in 5 mM citrate buffer at pH 4 in the presence or absence of 200 mM NaCl. Trypsin was added at a final concentration of 0.1  $\mu\text{M}$ . Such a T domain:trypsin ratio was necessary due to the low proteolytic activity of the enzyme at acidic pH. Samples were incubated at  $22^{\circ}\text{C}$  for the indicated time, and proteolysis was blocked by the addition of AEBSEF at a final concentration of 200  $\mu\text{M}$ ; samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Protein cleavage was then analyzed by SDS-PAGE on a 15% gel followed by electro-transfer on a PVDF membrane and Coomassie blue staining. Stained bands corresponding to cleaved protein fragments were cut out from the membrane and sequenced by automated N-terminal Edman degradation.

## RESULTS

The T domain carries two Trp residues, one at position 206 on helix TH1 and the other at position 281 on helix

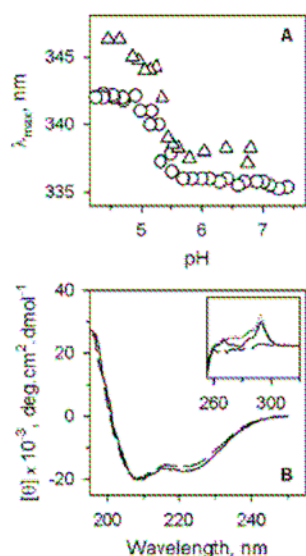


FIGURE 2: Effect of pH on the conformation of W281F and the WT T domain in solution. (A)  $\lambda_{\max}$  of Trp fluorescence of W281F ( $\Delta$ ) and WT T domain ( $\circ$ ) as a function of pH. (B) Far-UV CD spectra obtained for W281F at pH 7 (—) and pH 4 (---). The inset shows the near-UV CD spectra recorded under the same pH conditions for W281F and at pH 7 for WT T (thin line).

TH5 (Figure 1). To monitor the conformational changes affecting the N-terminal part of the T domain both in solution and interacting with membranes, we constructed the single Trp mutant W281F. The remaining Trp 206 was used as a fluorescent probe monitoring the changes in the environment of helix TH1. We studied whether the W281F mutation affected the conformational change of the T domain induced at acidic pH, which is responsible for membrane binding. The Trp fluorescence of both proteins, the W281F mutant [Figure 2A ( $\Delta$ )] and the wild-type (WT) T domain [Figure 2A ( $\circ$ )], was measured as a function of pH. As the pH decreases, a shift of  $\lambda_{\max}$  toward red wavelengths was observed for both proteins. This reflected a partial exposure of their Trp to the aqueous phase at acidic pH. The  $\lambda_{\max}$  of W281F was close to that of the WT T domain at neutral pH (338 vs 336  $\pm$  0.5 nm) and higher at acidic pH (346 vs 342  $\pm$  0.5 nm). We then checked that for W281F this pH-induced transition was related to the adoption of a molten globule state as shown previously for the WT T domain (28, 29). Far-UV CD spectra showed that both proteins exhibited a similar  $\alpha$ -helical content at pH 7 and 4 [Figure 2B for W281F, not shown for WT (28)]. At neutral pH, the two proteins also had similar near-UV CD spectra and the sharp dichroic band at 292 nm, assigned to a Lb band of Trp constrained in a chiral environment within the tertiary structure of the T domain, disappeared at acidic pH (Figure 2B, inset). This revealed an increase in mobility of Trp 206 at acidic pH.

We studied the binding of W281F to membranes as a function of pH. The WT T domain was used for comparison. The physical partition of both proteins between the aqueous phase and the membrane phase of a suspension of LUVs occurred between pH 7 and 6, all molecules being bound to the LUVs at pH 6 (Figure 3A,B). As described previously (28), the pH dependence of the binding was cooperative, with Hill coefficients around 3. The Trp fluorescence of W281F

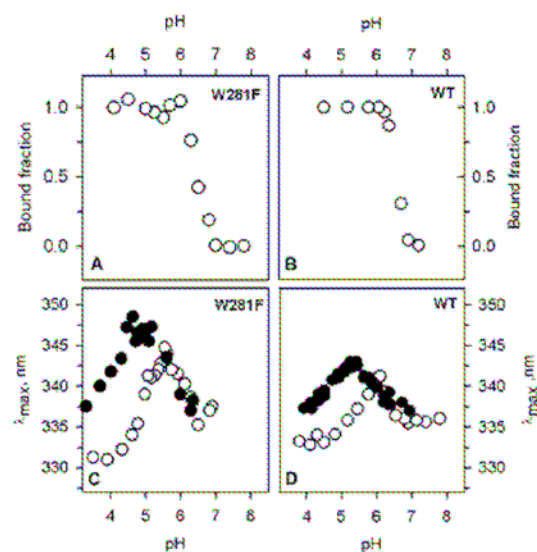


FIGURE 3: Effect of pH and NaCl on the interaction with membranes and conformation of W281F and WT T domain. (A and B) Partition of W281F and the WT T domain between buffer and anionic LUVs as a function of pH studied by ultracentrifugation. (C and D) Trp fluorescence of W281F and the WT T domain as a function of pH in the presence of anionic LUVs at an L:P of 500. Measurements were taken in the absence ( $\circ$ ) and presence ( $\bullet$ ) of 200 mM NaCl. The protein concentration was 1  $\mu$ M.

(Figure 3C) revealed that the interaction with the membrane took place in two steps, as for the WT T domain (Figure 3D). These experiments were performed in the absence and presence of NaCl because we showed previously that NaCl influenced this process for the WT T domain (28).

During the first step, from pH 7 to 5.8, the  $\lambda_{\max}$  of the fluorescence of W281F increased from about 338 to 345 nm [Figure 3C ( $\circ$ )], overlapping the binding monitored in centrifugation experiments (Figure 3A). This indicated progressive exposure of Trp 206 to a polar environment upon binding to the membrane. In the presence of NaCl, the first transition was extended to pH 5, the  $\lambda_{\max}$  reaching 347 nm (instead of 345 nm in the absence of NaCl) in the case of W281F [Figure 3C ( $\bullet$ )]. Then during the second step, from pH 5.8 to 4 and in the absence of NaCl, the  $\lambda_{\max}$  dropped from 345 to 331 nm [Figure 3C ( $\circ$ )]. This suggested that Trp 206 reached a hydrophobic environment while the protein was already bound to the membrane. At acidic pH, both proteins induced the leakage of dye (pyranine) encapsulated in LUVs (data not shown). The presence of NaCl shifted the second transition, which occurred at a pH more acidic by more than 1 pH unit. The WT T domain exhibited the same behavior, except that the amplitude of the fluorescence transition was lower due to the measurement of the fluorescence of both Trp residues. The NaCl effects shown here were larger than those described in our previous article (28) because the NaCl concentration was higher (200 mM instead of 100 mM).

To better characterize the environment of the N-terminal region of the T domain during the pH-dependent membrane interaction process, we measured the quenching of the Trp fluorescence of the W281F T domain by brominated phospholipids (38–42). We used lipids with bromines covalently bound at positions C6 and C7 of the acyl chains, close to the interfacial region of the membrane [(6-7BR)-PC]. We

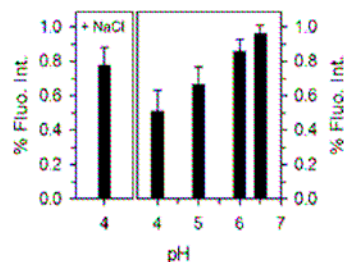


FIGURE 4: Quenching of the W281F T domain Trp fluorescence by brominated phospholipids. The pH dependency of Trp fluorescence quenching is measured in the presence of (6-7BR)-PC. The experiments were conducted with 500  $\mu$ M lipids and 1  $\mu$ M T, in the absence (right) and presence (left) of 200 mM NaCl.

performed the experiments at pH 7, 6, 5, and 4, in the presence and absence of NaCl. The results are expressed as the relative quenching efficiency of the initial Trp fluorescence by the brominated lipids (Figure 4): the lower the value, the closer the quencher from the Trp. During the membrane binding step, between pH 6.5 and 6, the quenching is low (up to 10%) (Figure 4, right). This suggests Trp 206 remained far from the quenchers while T was already bound to the membrane (Figure 3A). As the pH further decreases between pH 5 and 4, the quenching strongly increased, up to 50–60% (Figure 4). This indicated that the apolar milieu reached by the Trp ( $\lambda_{\text{max}}$ , 331 nm in Figure 3C) was the hydrophobic core of the lipid bilayer. At pH 4, the quenching was weaker in the presence of NaCl than in its absence (Figure 4, left). This indicated that the N-terminal region was less inserted in the membrane and located in a more polar environment in the presence of NaCl than in its absence. This corroborated the red shift of the  $\lambda_{\text{max}}$  of Trp fluorescence we measured with the addition of NaCl (Figure 3C, pH 4). Altogether, we showed that Trp 206 was exposed to the solvent in the membrane-bound state, while it penetrated the membrane during the second step of the membrane interaction process. This second step is sensitive to electrostatic interactions between the charges of the N-terminal region of T and lipid head groups.

To further describe the sensitivity of the N-terminal region of T to NaCl during interaction with the membrane, we performed a lipid titration at pH 4. We monitored the physical partition of W281F between the buffer and the membrane in a suspension of LUV at pH 4 as a function of lipid concentration (Figure 5A). Again, the WT T domain was used for comparison (Figure 5B). Both proteins were fully bound to the LUV at an L:P of 100. Binding was not influenced by the presence of NaCl. This suggested that, as already observed for the pH dependence of the interaction with the membrane, binding involved mainly hydrophobic effects. The Trp fluorescence of W281F in the presence of membranes (Figure 5C) revealed that the interaction with the membrane took place in two steps, as for the WT T domain (Figure 5D). But again, the modification of the fluorescence signal of W281F was much stronger, showing that Trp 206 was the main contributor to the signal of the WT T domain in the second transition. For these experiments, the ratio between the intensities at 360 and 320 nm (rFI) was used instead of the  $\lambda_{\text{max}}$  because this ratio could monitor the spectrum shift with a higher sensitivity (Figure 5C,D). The value of rFI decreased as the fluorescence spectrum

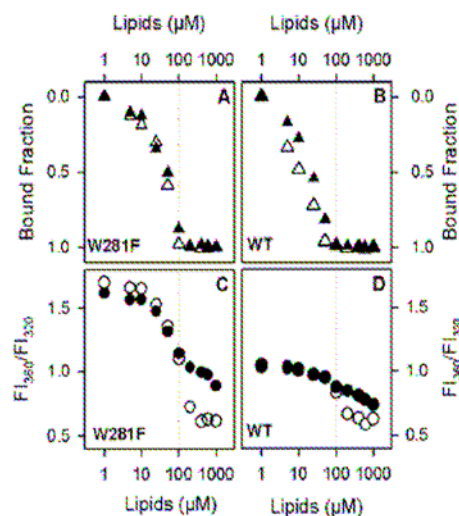


FIGURE 5: Interaction of W281F and the WT T domain with membranes at acidic pH as a function of lipid concentration. (A and B) Partition of W281F and the WT T domain between buffer and anionic LUVs at pH 4 as a function of lipid concentration studied by ultracentrifugation. Measurements were taken in the absence ( $\Delta$ ) and presence ( $\blacktriangle$ ) of 200 mM NaCl. (C and D) Trp fluorescence of W281F and the WT T domain at pH 4 as a function of lipid (LUV) concentration. Measurements were taken in the absence ( $\circ$ ) and presence ( $\bullet$ ) of 200 mM NaCl. The protein concentration was 1  $\mu$ M.  $F_{360}/F_{320}$  is the ratio of the fluorescence intensity at 360 nm to that at 320 nm.

shifted toward shorter wavelengths, i.e., as the Trp penetrated a hydrophobic environment. At pH 4 and in the absence of LUV, the  $\lambda_{\text{max}}$  of W281F was around 347 nm (Figure 2A). This gave an rFI value of around 1.7 (Figure 5C). In the case of the WT T domain, the  $\lambda_{\text{max}}$  was around 342 nm (Figure 2A), giving a rFI of around 1.0 (Figure 5D). When both proteins bound tightly to the lipid bilayer, the  $\lambda_{\text{max}}$  was around 332 nm (Figure 3C,D) and the rFI was then around 0.6 (Figure 5C,D). In the absence of NaCl, only one transition was observed, the Trp going from a polar to an apolar environment. However, in the presence of 200 mM NaCl, two steps could be distinguished. A first transition occurred up to an L:P of 100, and the environment of Trp 206 shifted progressively from polar to apolar as the L:P increased. This step was not affected by NaCl, and it paralleled the binding monitored in the partition experiments (Figure 5A,B). For L:P of >100, once all molecules were bound, a second transition occurred, Trp 206 further gaining a more hydrophobic environment [Figure 5C ( $\circ$ )]. In contrast to the first transition, NaCl inhibited this second transition and made it detectable [Figure 5C ( $\bullet$ )]. This showed that it was controlled by electrostatic interactions.

Trypsin cleaves polypeptides after lysine and arginine side chains (43). Interestingly, the T domain contains one arginine and 11 lysine residues within helices TH1–TH4 and one lysine in helix TH6 (Figures 1 and 6). Hence, the sensitivity of the T domain to trypsin digestion was studied as a marker of the accessibility of its N-terminal region. Experiments were conducted at pH 4, in solution and in the presence of membranes, in the presence and absence of NaCl. The concentration of trypsin was adjusted to make the proteolysis possible despite the acidic pH (see Materials and Methods). With membranes, experiments were conducted at an L:P of 500, at which the structural reorganization of the T domain

## Membrane Interaction of the Diphtheria Toxin T Domain

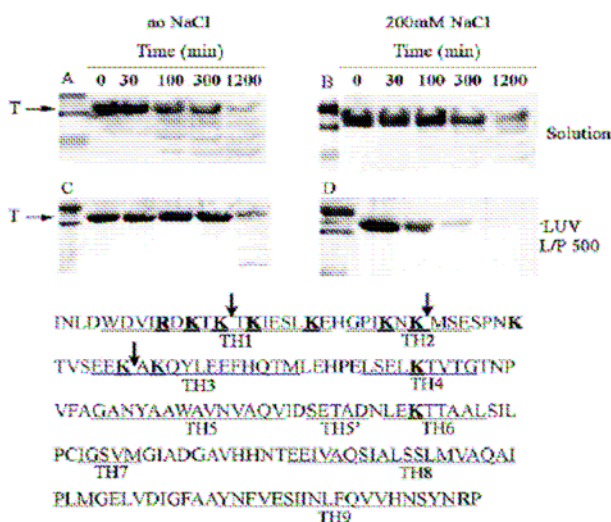


FIGURE 6: Trypsin digestion of the WT T domain at pH 4 in solution (A and B) and in interaction with anionic LUVs (C and D) in the absence (A and C) or presence (B and D) of NaCl. In the presence of membranes, the L:P was 500. Digestion times are given. The arrows over the sequence of the T domain indicate the main cleavage sites as determined by N-terminal sequencing.

in the membrane, i.e., the second step of the interaction, was fully achieved in the absence of NaCl but barely started in its presence (Figure 5C,D). The integrity of the T domain was evaluated by SDS-PAGE, and cleavage sites were identified by N-terminal sequencing of the protein fragments. Whatever the conditions that were assayed, when cleavage occurred, three main cleavage sites were found, in helices TH1–TH3 (Figure 6). In solution, the T domain was moderately sensitive to digestion. The proteolysis seemed slightly slower in the presence of NaCl. When bound to membranes, the T domain became more resistant to digestion in the absence of NaCl, i.e., when the two steps of the interaction with the membranes were completed under the conditions used for the experiment. On the other hand, in the presence of NaCl, i.e., after the first step only (the binding) was completed for an L:P value of 500, the digestion was significantly faster.

We have shown that the N-terminal region of the T domain underwent a significant structural reorganization during the process of insertion into the membrane. To examine whether the physicochemical properties of the sequences of the N-terminal helices of the T domain may play a role in the binding process, and more particularly in its pH dependence, four peptides corresponding to the helices TH1–TH4 were synthesized (Figure 1). A Trp was included in each peptide as a fluorescent probe, except for TH1, which contained the native Trp 206. We measured the fluorescence of each peptide as a function of pH in the absence and presence of anionic SUVs. No binding of the peptides to LUVs has been detected. In the absence of SUVs, the  $\lambda_{\text{max}}$  of each peptide remained around 354 nm whatever the pH (not shown). In the presence of SUVs, the  $\lambda_{\text{max}}$  of peptides TH1 [Figure 7A (○)], TH3 [Figure 7C (Δ)], and TH4 [Figure 7C (□)] shifted toward lower values as the pH decreased. For the three peptides, the changes occurred within similar pH ranges between pH 6 and 4. The transition was sharper in the case of TH3. This indicated that the transition for this peptide

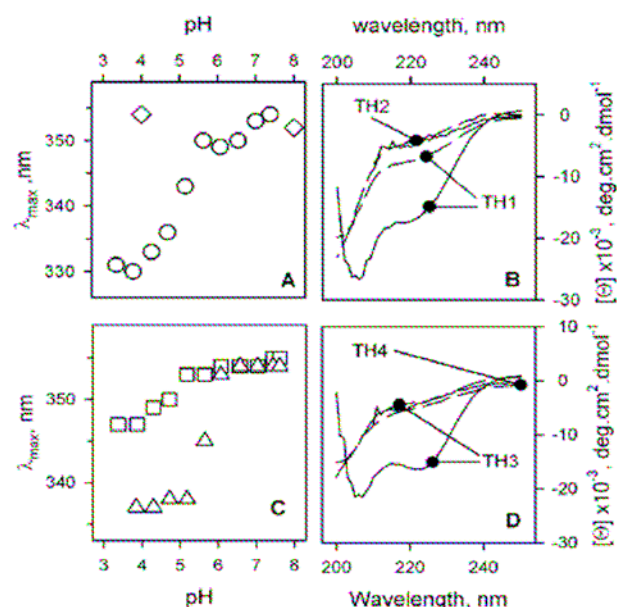


FIGURE 7: Interaction of peptides TH1–TH4 with membranes as a function of pH. (A and C) The  $\lambda_{\text{max}}$  of Trp fluorescence of the peptides was measured as a function of pH in the presence of anionic SUVs at an L:P of 1000. Acidification did not affect the  $\lambda_{\text{max}}$  of the peptides in the absence of SUVs (not shown): TH1 (○), TH2 (◇), TH3 (Δ), and TH4 (□). (B and D) Far-UV CD spectra obtained for the peptides at pH 4 in the absence (---) or presence (—) of anionic SUVs.

was cooperative, probably because of oligomerization upon binding to the lipid bilayer. Below pH 4, the  $\lambda_{\text{max}}$  of these peptides reached 330, 337, and 347 nm, respectively. This indicated that the Trp residues of these peptides were progressively surrounded by an apolar environment, suggesting binding of the peptides and penetration into the lipid bilayer. In contrast, the  $\lambda_{\text{max}}$  of TH2 remained constant [Figure 7A (◇)]. The fluorescence quenching by brominated lipids was measured to determine if the blue shift of the fluorescence spectra was due to the penetration of the peptides within the hydrophobic core of the membrane. The quenching observed for TH1 and TH3 was 42 and 48%, respectively. In parallel, far-UV CD spectra of the peptides were recorded at pH 4, in the absence and presence of SUVs (Figure 7B,D). All peptides were poorly structured in the absence of membranes [Figure 7B,D (---)]. The presence of NaCl had no effect on the secondary structure content of the peptides in solution whatever the pH (data not shown). Interestingly, peptides TH1 and TH3 generated significant signals of  $\alpha$ -helices at acidic pH in the presence of SUVs [Figure 7B,D (—)]. This suggested that binding of peptides TH1 and TH3 to the SUVs triggered their folding into  $\alpha$ -helices.

We then investigated the effect of ionic strength on the interaction of the peptides with the membrane. For this purpose, we monitored the fluorescence of each peptide as a function of phospholipid concentration, at pH 8 and 4, in the absence and presence of NaCl (Figure 8). At pH 8, the  $\lambda_{\text{max}}$  of the fluorescence of the peptides was moderately affected or not at all as L:P increased [Figure 8 (Δ)]. In contrast, at pH 4 and in the absence of NaCl, the  $\lambda_{\text{max}}$  of peptides TH1 and TH3 and to a lesser extent that of TH4

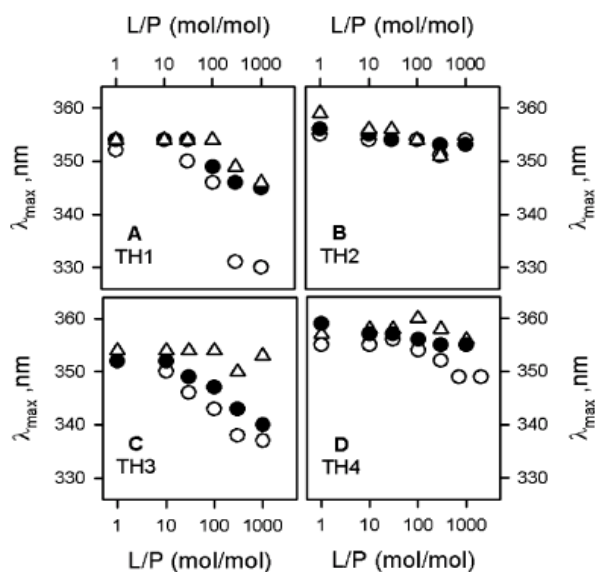


FIGURE 8: Interaction of peptides TH1–TH4 with membranes as a function of lipid concentration and NaCl at pH 8 and 4. The  $\lambda_{\max}$  of Trp fluorescence of the peptides was measured in the presence of increasing concentrations of lipids (anionic SUVs) at pH 8 ( $\Delta$ ) or pH 4 in the absence ( $\circ$ ) or presence ( $\bullet$ ) of 200 mM NaCl. The peptide concentration was 2  $\mu$ M.

shifted toward lower values [Figure 8 ( $\circ$ )]. This was expected from the previous experiment (Figure 7A). Maximum shifts were reached around an L:P of 300–1000. Interestingly, NaCl inhibited these shifts for peptides TH1 and TH4 but had practically no effect for TH3 (Figure 8). Again, the fluorescence of TH2 was not affected under any of the conditions that were assayed. Collectively, the data strongly suggest that the isolated peptides TH1, TH3, and to a lesser extent TH4 have the intrinsic propensity to bind to membranes at acidic pH but not TH2. In addition, binding induced the folding of TH1 and TH3 into  $\alpha$ -helices. The fact that binding of TH1 and TH4 was inhibited by NaCl showed that electrostatic interactions were involved. In contrast, binding of TH3 was not, which suggested that hydrophobic effects were preponderant in that case. Noteworthy is the fact that the pH dependences of the interactions of the three peptides TH1, TH3, and TH4 with membranes were similar to that of the second transition detected with the whole T domain.

## DISCUSSION

In a previous article, we have described two steps in the pH-dependent interaction between the T domain and the membrane (28). The binding to the membrane occurs in a first step and involves mainly hydrophobic forces. The functional state of the T domain appears in a second step, at more acidic pH, and induces a permeabilization of the membrane. The sensitivity of this second step to the presence of NaCl shows that electrostatic interactions between the T domain and the lipid bilayer interface are required. On the basis of our observations, we have proposed that the N-terminal region of the T domain, which is made of amphiphilic  $\alpha$ -helices, plays a key role in the second step of the interaction, i.e., the formation of the functional state of the T domain. We have also proposed that the interactions

between the amphiphilic  $\alpha$ -helices of the T domain and the acidic phospholipid head groups become attractive due to the protonation of the side chains of acidic amino acid residues upon acidification of the environment. This phenomenon allows a tighter interaction between the N-terminal region and the membrane interface. These hypotheses have been tested here. We have produced a W281F T domain harboring a unique and native Trp 206, located at the N-terminal extremity of TH1. This Trp has been used as a reporter of the conformational changes undergone by this region of the protein. We also investigated the intrinsic propensity of the amino acid sequences of the four N-terminal helices to interact with membranes using peptides.

In solution, our results showed that the W281F mutant and the WT T domain displayed the same pH-dependent conformational changes, leading to a molten globule state (Figure 2), as previously characterized for the WT T domain (28): the secondary structures remained natively like, while the tertiary structure was lost. In the presence of negatively charged membranes, both WT and W281F T domains exhibit similar behavior, the later allowing a detailed characterization of the molecular events occurring in the N-terminal part of the T domain.

From pH 8 to 6, the T domain binds to the membrane and is insensitive to NaCl as shown by partition experiments. During this process, Trp 206 becomes more exposed to a polar environment, which could be the solvent or the proximity to charged side chains of amino acids. In the membrane-bound state, at pH  $\sim$ 6, Trp 206 is solvated, as revealed by its red  $\lambda_{\max}$  and the negligible quenching of its fluorescence by brominated lipids. Hence, the acquisition of the membrane-bound state is mainly driven by hydrophobic effects between the C-terminal part of the T domain and the membrane. From pH 6 to 4, the functional, membrane-inserted state is stabilized. Our results provide direct evidence that the behavior of the N-terminal part of the T domain is crucial in this second step of the membrane interaction process. Indeed, the  $\lambda_{\max}$  of Trp 206 experienced a marked blue shift, from 347 to 331 nm, which was concomitant with a strong quenching of Trp fluorescence by brominated lipids. This second transition is highly sensitive to the presence of NaCl, revealing the electrostatic contribution to the interaction between this region of T and the anionic lipid head groups of the membrane. Moreover, peptides TH1, TH3, and TH4 clearly exhibited pH-dependent membrane binding. Altogether, these results clearly demonstrate that once T is bound to the membrane via hydrophobic effects, its N-terminal region moves progressively from the solvent into the membrane environment. We propose these helices reach the interfacial region of the membrane.

Two steps are also observed during the interaction of the T domain with the membrane as a function of the lipid concentration at pH 4 (Figure 5). The first step (from 0 to 100  $\mu$ M lipid) is monitored by partition experiments and is insensitive to the presence of NaCl (Figure 5A,B). Hence, this first step corresponds to the binding of the T domain to the lipid bilayer and is mostly driven by hydrophobic forces. Interestingly, the first step of the pH-dependent membrane interaction corresponds also to the membrane binding of T mainly through hydrophobic effects. The environment of the Trp residues is modified upon binding (Figure 5C,D, vertical dotted line). However, at this stage (pH 4 and 100  $\mu$ M lipid),



Trp 206 is located in a less polar environment ( $\lambda_{\max} = 337$  nm and  $rFI = 1.1$ ; Figure 5C, vertical dotted line) than in the case of the interaction monitored as a function of pH ( $\lambda_{\max} = 345$  nm; Figure 3C). We propose the following explanation for the difference in polarity surrounding Trp 206 once T is bound to the membrane at both pHs. When the membrane binding of T as a function of lipid concentration is monitored at pH 4, electrostatic repulsions between the protonated acidic side chains of the protein and the anionic phospholipid head groups are abolished. This is not the case when binding is monitored as a function of pH (in the presence of 500  $\mu$ M lipid) because the first step is completed around pH 6, the pH at which acidic side chains are still negatively charged. This shows that the electrostatic interactions have an effect on the conformation of the T domain upon binding, although they are not required at this stage of the interaction. In contrast to the first step, the second step detected when monitoring the interaction as a function of lipid concentration is inhibited in the presence of NaCl; i.e., electrostatic attractions between the basic side chains of the protein and the acidic phospholipids are required. The two steps are clearly distinguished in the presence of NaCl. This is particularly true in the case of W281F (Figure 5C). The value of  $\lambda_{\max}$  and the quenching of Trp fluorescence by brominated lipids both indicate that the Trp residues are located inside the membrane.

The changes in  $\lambda_{\max}$  detected for W281F when monitoring the interaction of the protein with the bilayer as a function of pH or as a function of lipid concentration are similar to those reported for the WT T domain. The remaining Trp of W281F, at the tip of helix TH1, is located in a polar environment upon binding to the lipid bilayer and then penetrates progressively into an apolar milieu during the second step of the interaction, leading to the functional state of the T domain. This suggests that the environment of the N-terminal region of the T domain changes dramatically during the interaction with the membrane. At an L:P of 500 and at pH 4 (Figure 5), the domain is stabilized in the intermediate state (between the first and second step) in the presence of NaCl while it is in the functional state in the absence of salt (the second step is completed). This allowed the investigation of the accessibility of the N-terminal part of the T domain to proteolysis (Figure 6). This part of the protein is accessible to the proteases in the intermediate state of the interaction, and it becomes protected against proteolysis in the functional state. Therefore, not only TH1 but the whole amphiphilic N-terminal part (TH1–TH4) becomes less accessible to the solvent during the second step of the interaction, whereas it is quite accessible after the binding.

The results support the hypothesis that, during the second step, the interaction between the N-terminal region of the T domain and the lipid bilayer interface is controlled by hydrophobic forces together with electrostatic interactions, both repulsive and attractive (28). According to our hypothesis, during the second step, as the pH decreases, the acidic side chains of the N-terminal amphiphilic helices are protonated and the repulsive interactions with the acidic phospholipids are abolished. Then, only the favorable interactions, the hydrophobic and the electrostatic attraction between the basic side chains and the acidic phospholipids, remain, and the interactions between the N-terminal region of the T domain and the lipid bilayer interface are tighter.

To provide further evidence of this proposition, we have investigated the interactions of peptides corresponding to the amphiphilic helices of the N-terminal region (TH1–TH4) (Figure 1).

Among the four peptides investigated here, TH1 and TH3 exhibit tight interaction with SUVs, TH4 exhibits a weak interaction detected by fluorescence, and TH2 exhibits no interaction (Figures 7 and 8). We noticed membrane interaction is stronger in the presence of SUVs than in the presence of LUVs. The high membrane curvature of SUVs induces an asymmetric distribution of lipids between the two leaflets (44), resulting in a smaller order parameter and a weaker lateral pressure of lipids in the outer leaflet of the vesicle (45–52). As a consequence, the first hydrocarbon groups following the ester bond of lipids in SUVs are more exposed to the membrane interface than in LUVs, and the hydrophobic interactions are facilitated (53). These effects explain the binding of the peptides to SUVs rather than to LUVs.

Whatever the pH, in the absence and presence of NaCl, the four peptides adopt random coil conformations (Figure 7B,D and not shown). TH1 and TH3 become  $\alpha$ -helical at acidic pH due to their binding to lipid vesicles. The formation of hydrogen bonds is concomitant with the interaction of the peptides with the lipid bilayer in minimizing the energy of the system and leads to the formation of  $\alpha$ -helices (54, 55). The interaction of TH1 and TH3 with the lipid vesicles occurs in a pH range similar to that of the whole T domain, i.e., between pH 6 and 4 (Figure 7A,C). This is also true for the weak interaction of TH4 (Figure 7C). As described for other peptides, this pH dependence is due to the protonation of the acidic side chains (56–58). Both TH1 and TH3 contain five acidic side chains (Asp or Glu) (Figure 1). In the presence of NaCl, the interaction of TH1 with the lipid vesicles is inhibited while that of TH3 remains mostly unaltered (Figure 8A,C), suggesting that the electrostatic interactions are less preponderant in the case of TH3. This can be related to the number of basic amino acids (Arg or Lys) present in the peptide. Peptide TH1 contains five basic side chains, while peptide TH3 has only two of those. It is likely that, upon protonation of its acidic side chains, TH3 becomes hydrophobic enough for the interaction and the attractive interactions between the basic side chains and the acidic phospholipids are not essential. In the case of peptide TH1, these interactions are required, which is the case for the formation of the functional state of the T domain. These results provide direct evidence that the four peptides behave differently. Nevertheless, they also clearly show that the N-terminal sequence of T has an intrinsic propensity to interact with anionic lipid bilayers in a pH-dependent manner.

Overall, our results highlight the role of the amphiphilic N-terminal region of the T domain through the membrane insertion process. The formation of the functional state is related to a change in the location of the amphiphilic helices, from a solvent-exposed location in the membrane-bound state at pH 6 to an apolar environment in the membrane-inserted state at pH 4. The interaction of these helices with the membrane is controlled by the balance between attractive and repulsive electrostatic interactions. As shown here, the binding of these amphiphilic  $\alpha$ -helices depends on the protonation of their acidic side chains. The interplay between the pH dependence of electrostatic repulsion between the acidic side chains and the acidic phospholipid head groups

and the electrostatic attraction due to the basic side chains allows a tight control by the pH of the formation of the functional state of the T domain. It also provides sensitivity of the translocation of this part of the domain to the pH gradient across the endosome membrane and hence facilitates the translocation of the catalytic domain of the toxin.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Robert Thai for N-terminal protein sequencing and Mélanie Leleu and Bernard Maillère for peptide synthesis.

#### REFERENCES

- Mosior, M., and Epand, R. M. (1997) Protein kinase C: An example of a calcium-regulated protein binding to membranes. *Mol. Membr. Biol.* **14**, 65–70.
- Muller, G., and Bandlow, W. (1989) An amphitropic cAMP-binding protein in yeast mitochondria. I. Synergistic control of the intramitochondrial location by calcium and phospholipids. *Biochemistry* **28**, 9957–9967.
- Cheng, E. H., Levine, B., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Hardwick, J. M. (1996) Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* **379**, 554–556.
- Neve, E. P., Hidestrand, M., and Ingelman-Sundberg, M. (2003) Identification of sequences responsible for intracellular targeting and membrane binding of rat CYP2E1 in yeast. *Biochemistry* **42**, 14566–14575.
- Mosevitsky, M. I. (2005) Nerve ending “signal” proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1. *Int. Rev. Cytol.* **245**, 245–325.
- Bose, H. S., Whittal, R. M., Baldwin, M. A., and Miller, W. L. (1999) The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7250–7255.
- Torok, Z., Goloubinoff, P., Horvath, I., Tsvetkova, N. M., Glatz, A., Balogh, G., et al. (2001) Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3098–3103.
- Richter, R. P., Him, J. L., Tessier, B., Tessier, C., and Brisson, A. R. (2005) On the kinetics of adsorption and two-dimensional self-assembly of annexin A5 on supported lipid bilayers. *Biophys. J.* **89**, 3372–3385.
- Johnson, J. E., Xie, M., Singh, L. M., Edge, R., and Cornell, R. B. (2003) Both acidic and basic amino acids in an amphitropic enzyme, CTP:phosphocholine cytidylyltransferase, dictate its selectivity for anionic membranes. *J. Biol. Chem.* **278**, 514–522.
- Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R., et al. (2002) Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361–366.
- Del Boca, M., Caputto, B. L., Maggio, B., and Bortoli, G. A. (2005) c-Jun interacts with phospholipids and c-Fos at the interface. *J. Colloid Interface Sci.* **287**, 80–84.
- Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2005) Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 135–142.
- Sekimizu, K., and Kornberg, A. (1988) Cardiolipin activation of dnaA protein, the initiation protein of replication in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 7131–7135.
- Zakharov, S. D., and Cramer, W. A. (2002) Colicin crystal structures: Pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1563**, 333–346.
- Dowhan, W., Mileykovskaya, E., and Bogdanov, M. (2004) Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 19–39.
- Kim, J., Shishido, T., Jiang, X., Aderem, A., and McLaughlin, S. (1994) Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **269**, 28214–28219.
- Chenal, A., Vernier, G., Savarin, P., Bushmarina, N. A., Geze, A., Guillain, F., et al. (2005) Conformational states and thermodynamics of  $\alpha$ -lactalbumin bound to membranes: A case study of the effects of pH, calcium, lipid membrane curvature and charge. *J. Mol. Biol.* **349**, 890–905.
- Menetrey, J., Gillet, D., and Menez, A. (2005) Structural features common to intracellularly acting toxins from bacteria. *Toxicon* **45**, 129–137.
- Chenal, A., Nizard, P., and Gillet, D. (2002) Structure and function of diphtheria toxin: From pathology to engineering. *J. Toxicol., Toxin Rev.* **21**, 321–359.
- Bennett, M. J., and Eisenberg, D. (1994) Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.* **3**, 1464–1475.
- Lemichez, E., Bomsel, M., Devilliers, G., vanderSpek, J., Murphy, J. R., Lukianov, E. V., Olsnes, S., and Boquet, P. (1997) Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery. *Mol. Microbiol.* **23**, 445–457.
- Senzel, L., Huynh, P. D., Jakes, K. S., Collier, R. J., and Finkelstein, A. (1998) The diphtheria toxin channel-forming T domain translocates its own NH<sub>2</sub>-terminal region across planar bilayers. *J. Gen. Physiol.* **112**, 317–324.
- Oh, K. J., Senzel, L., Collier, R. J., and Finkelstein, A. (1999) Translocation of the catalytic domain of diphtheria toxin across planar phospholipid bilayers by its own T domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 8467–8470.
- Lemichez, E., and Boquet, P. (2003) To be helped or not helped, that is the question. *J. Cell Biol.* **160**, 991–992.
- Falnes, P. O., and Olsnes, S. (1995) Cell-mediated reduction and incomplete membrane translocation of diphtheria toxin mutants with internal disulfides in the A fragment. *J. Biol. Chem.* **270**, 20787–20793.
- Ratts, R., Zeng, H., Berg, E. A., Blue, C., McComb, M. E., Costello, C. E., vanderSpek, J., Harrison, R., and Murphy, J. R. (2003) The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex. *J. Cell Biol.* **160**, 1139–1150.
- Ratts, R., Trujillo, C., Bharti, A., vanderSpek, J., Harrison, R., and Murphy, J. R. (2005) A conserved motif in transmembrane helix 1 of diphtheria toxin mediates catalytic domain delivery to the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15635–15640.
- Chenal, A., Savarin, P., Nizard, P., Guillain, F., Gillet, D., and Forge, V. (2002) Membrane protein insertion regulated by bringing electrostatic and hydrophobic interactions into play<sup>®</sup>: A case study with the translocation domain of the diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **277**, 43425–43432.
- Chenal, A., Nizard, P., Forge, V., Pugnieri, M., Roy, M. O., Mani, J. C., Guillain, F., and Gillet, D. (2002) Does fusion of domains from unrelated proteins affect their folding pathways and the structural changes involved in their function? A case study with the diphtheria toxin T domain. *Protein Eng.* **15**, 383–391.
- Zhan, H., Choe, S., Huynh, P. D., Finkelstein, A., Eisenberg, D., and Collier, R. J. (1994) Dynamic transitions of the transmembrane domain of diphtheria toxin: Disulfide trapping and fluorescence proximity studies. *Biochemistry* **33**, 11254–11263.
- D’Silva, P. R., and Lala, A. K. (1998) Unfolding of diphtheria toxin. Identification of hydrophobic sites exposed on lowering of pH by photolabeling. *J. Biol. Chem.* **273**, 16216–16222.
- Malenbaum, S. E., Collier, R. J., and London, E. (1998) Membrane topography of the T domain of diphtheria toxin probed with single tryptophan mutants. *Biochemistry* **37**, 17915–17922.
- Ladokhin, A. S., Legmann, R., Collier, R. J., and White, S. H. (2004) Reversible refolding of the diphtheria toxin T-domain on lipid membranes. *Biochemistry* **43**, 7451–7458.
- Zhao, G., and London, E. (2005) Behavior of diphtheria toxin T domain containing substitutions that block normal membrane insertion at Pro345 and Leu307: Control of deep membrane insertion and coupling between deep insertion of hydrophobic subdomains. *Biochemistry* **44**, 4488–4498.
- Sharpe, J. C., Kachel, K., and London, E. (1999) The Effects of Inhibitors Upon Pore Formation by Diphtheria Toxin and Diphtheria Toxin T Domain. *J. Membr. Biol.* **171**, 223–233.
- Rosconi, M. P., and London, E. (2002) Topography of helices 5–7 in membrane-inserted diphtheria toxin T domain: Identification and insertion boundaries of two hydrophobic sequences that do not form a stable transmembrane hairpin. *J. Biol. Chem.* **277**, 16517–16527.
- D’Silva, P. R., and Lala, A. K. (2000) Organization of diphtheria toxin in membranes. A hydrophobic photolabeling study. *J. Biol. Chem.* **275**, 11771–11777.
- Jain, M. K., and Maliwal, B. P. (1985) The environment of tryptophan in pig pancreatic phospholipase A2 bound to bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **814**, 135–140.

39. Berkhout, T. A., Rietveld, A., and de Kruijff, B. (1987) Preferential lipid association and mode of penetration of apocytochrome c in mixed model membranes as monitored by tryptophanyl fluorescence quenching using brominated phospholipids, *Biochim. Biophys. Acta* 897, 1–4.
40. Voglino, L., Simon, S. A., and McIntosh, T. J. (1999) Orientation of LamB signal peptides in bilayers: Influence of lipid probes on peptide binding and interpretation of fluorescence quenching data, *Biochemistry* 38, 7509–7516.
41. Raja, S. M., Rawat, S. S., Chattopadhyay, A., and Lala, A. K. (1999) Localization and environment of tryptophans in soluble and membrane-bound states of a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*, *Biophys. J.* 76, 1469–1479.
42. Thuduppathy, G. R., Craig, J. W., Kholodenko, V., Schon, A., and Hill, R. B. (2006) Evidence that membrane insertion of the cytosolic domain of Bcl-xL is governed by an electrostatic mechanism, *J. Mol. Biol.* 359, 1045–1058.
43. Brown, W. E., and Wold, F. (1973) Alkyl isocyanates as active-site-specific reagents for serine proteases. Reaction properties, *Biochemistry* 12, 828–834.
44. Cullis, P. R., Fenske, D. B., and Hope, M. J. (1996) in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Vance, D. E., and Vance, J. E., Eds.) Elsevier Sciences B.V., Amsterdam.
45. Swairjo, M. A., Seaton, B. A., and Roberts, M. F. (1994) Effect of vesicle composition and curvature on the dissociation of phosphatidic acid in small unilamellar vesicles: A <sup>31</sup>P-NMR study, *Biochim. Biophys. Acta* 1191, 354–361.
46. Lepore, L. S., Ellena, J. F., and Cafiso, D. S. (1992) Comparison of the lipid acyl chain dynamics between small and large unilamellar vesicles, *Biophys. J.* 61, 767–775.
47. Korstanje, L. J., van Faassen, E. E., and Levine, Y. K. (1989) Reorientational dynamics in lipid vesicles and liposomes studied with ESR: Effects of hydration, curvature and unsaturation, *Biochim. Biophys. Acta* 982, 196–204.
48. Talbot, W. A., Zheng, L. X., and Lentz, B. R. (1997) Acyl chain unsaturation and vesicle curvature alter outer leaflet packing and promote poly(ethylene glycol)-mediated membrane fusion, *Biochemistry* 36, 5827–5836.
49. van den Brink-van der Laan, E., Killian, J. A., and de Kruijff, B. (2004) Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile, *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 275–288.
50. Dan, N., and Safran, S. A. (1998) Effect of lipid characteristics on the structure of transmembrane proteins, *Biophys. J.* 75, 1410–1414.
51. Brumm, T., Jorgensen, K., Mouritsen, O. G., and Bayerl, T. M. (1996) The effect of increasing membrane curvature on the phase transition and mixing behavior of a dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine/distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine lipid mixture as studied by Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry, *Biophys. J.* 70, 1373–1379.
52. Cantor, R. S. (1999) Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers, *Biophys. J.* 76, 2625–2639.
53. Heerklotz, H., and Epan, R. M. (2001) The enthalpy of acyl chain packing and the apparent water-accessible apolar surface area of phospholipids, *Biophys. J.* 80, 271–279.
54. Ladokhin, A. S., and White, S. H. (1999) Folding of amphipathic  $\alpha$ -helices on membranes: Energetics of helix formation by melittin, *J. Mol. Biol.* 285, 1363–1369.
55. White, S. H., and Wimley, W. C. (1999) Membrane protein folding and stability: Physical principles, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 319–365.
56. Leenhouts, J. M., van den Wijngaard, P. W., de Kroon, A. I., and de Kruijff, B. (1995) Anionic phospholipids can mediate membrane insertion of the anionic part of a bound peptide, *FEBS Lett.* 370, 189–192.
57. Liu, L. P., and Deber, C. M. (1997) Anionic phospholipids modulate peptide insertion into membranes, *Biochemistry* 36, 5476–5482.
58. Parente, R. A., Nadasdi, L., Subbarao, N. K., and Szoka, F. C., Jr. (1990) Association of a pH-sensitive peptide with membrane vesicles: Role of amino acid sequence, *Biochemistry* 29, 8713–8719.

BI602381Z

## Interactions of apomyoglobin with membranes: Mechanisms and effects on heme uptake

GRÉGORY VERNIER,<sup>1,2</sup> ALEXANDRE CHENAL,<sup>1,3</sup> HEIDI VITRAC,  
ROYA BARUMANDZADHE, CAROLINE MONTAGNER, AND VINCENT FORGE

Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 5090, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA-Grenoble, 38054 Grenoble cedex 9, France

(RECEIVED August 30, 2006; FINAL REVISION November 22, 2006; ACCEPTED November 27, 2006)

### Abstract

The last step of the folding reaction of myoglobin is the incorporation of a prosthetic group. In cells, myoglobin is soluble, while heme resides in the mitochondrial membrane. We report here an exhaustive study of the interactions of apomyoglobin with lipid vesicles. We show that apomyoglobin interacts with large unilamellar vesicles under acidic conditions, and that this requires the presence of negatively charged phospholipids. The pH dependence of apomyoglobin interactions with membranes is a two-step process, and involves a partially folded state stabilized at acidic pH. An evident role for the interaction of apomyoglobin with lipid bilayers would be to facilitate the uptake of heme from the outer mitochondrial membrane. However, heme binding to apomyoglobin is observed at neutral pH when the protein remains in solution, and slows down as the pH becomes more favorable to membrane interactions. The effective incorporation of soluble heme into apomyoglobin at neutral pH suggests that the interaction of apomyoglobin with membranes is not necessary for the heme uptake from the lipid bilayer. *In vivo*, however, the ability of apomyoglobin to interact with membrane may facilitate its localization in the vicinity of the mitochondrial membranes, and so may increase the yield of heme uptake. Moreover, the behavior of apomyoglobin in the presence of membranes shows striking similarities with that of other proteins with a globin fold. This suggests that the globin fold is well adapted for soluble proteins whose functions require interactions with membranes.

**Keywords:** apomyoglobin; protein/membrane interactions; large unilamellar vesicles; amphitropic proteins; globin fold; heme uptake; protein folding

<sup>3</sup>These authors contributed equally.

Present addresses: <sup>2</sup>Harvard Medical School, Department of Microbiology and Molecular Genetics, 200 Longwood Avenue, Boston, MA 02115, USA. <sup>3</sup>Biochemistry of Macromolecular Interactions Unit, Pasteur Institute, 75724 Paris Cedex 15, France.

Reprint requests to: Vincent Forge, Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Unité Mixte de Recherche 5090, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA-Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France; e-mail: vincent.forge@cea.fr; fax: 04-38-78-54-87.

**Abbreviations:** aMb: sperm whale apomyoglobin; dT: diphtheria toxin translocation domain; LUVs: large unilamellar vesicles; <sup>-</sup>LUVs: anionic LUVs; <sup>z</sup>LUVs: zwitterionic LUVs; EPC: egg phosphatidylcholine; EPA: egg phosphatidic acid; Trp: tryptophan.

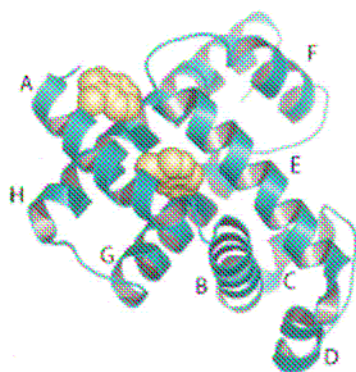
Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1110/ps.062531207>.

Hemoglobin and myoglobin are heme proteins in charge of the storage and delivery of oxygen (O<sub>2</sub>). Hemoglobin carries oxygen in red blood cells, and myoglobin transports it in the cytosol of O<sub>2</sub>-consuming myocytes, such as those of cardiac muscles and red skeletal muscle fibers (Wittenberg and Wittenberg 2003). The physiological process of O<sub>2</sub> transport requires the reversible binding of O<sub>2</sub> molecules to the prosthetic ferrous heme group embedded within myoglobin. The insertion of heme within apomyoglobin (aMb) is necessary for the folding into the functional holomyoglobin (hMb) form.

While aMb is produced in the sarcoplasm, the heme is synthesized in the inner mitochondrial membrane (Ferreira 1999; Dailey 2002). Heme partition between

water and lipids is strongly lipophilic, with a partition constant of around  $10^5$ – $10^6$  (Light 3rd and Olson 1990). Hence, considering that aMb and the prosthetic group are synthesized in different cell compartments, and that the protein is hydrophilic while heme is lipophilic, the location and circumstances of heme binding to aMb remain open questions. Previous reports have provided in vitro evidence that the presence of hemoglobin and aMb induces heme efflux from the membrane (Rose and Olson 1983; Cannon et al. 1984; Rose et al. 1985; Szebeni et al. 1985, 1988; Light 3rd and Olson 1990). The interactions of aMb with membranes (Lee and Kim 1992; Basova et al. 2004) suggest that the heme binding within the hydrophobic pocket of aMb requires the interaction of the protein with the mitochondrial outer membrane. However, clear evidence for such mechanisms is still missing. According to one report, the difference in the affinity of heme for the lipid bilayer and the protein allows heme transfer (Rose et al. 1985). The involvement of a chaperone has also been proposed (Jakoby 1978).

Sperm whale myoglobin is a 153-amino-acid protein containing eight  $\alpha$ -helices (A to H) (Fig. 1) (Griko et al. 1988). This is the most studied and best known member of the globin family, which is characterized by a structure comprising a bundle of six to 10  $\alpha$ -helices (Holm and Sander 1993a,b). The globin fold is found in numerous proteins driven to interact with membranes for their functions. It can be recognized as an autonomous part of bacterial toxins, within domains specialized in the interactions with membranes. Well-documented examples are pore-forming domains of colicins (Parker et al. 1989; Holm and Sander 1993a,b) and the translocation domain of diphtheria toxin (Choe et al. 1992; Bennett et al. 1994). The globin fold is found also in the proteins of the Bcl-2 family, which are involved in the regulation of the apoptosis (Fesik 2000). Despite a lower stability, the



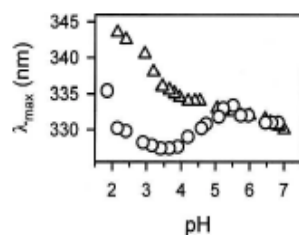
**Figure 1.** Ribbon representation of aMb. The  $\alpha$ -helices are marked with letters from A to H. The side chains of Trp7 and Trp14 located within the  $\alpha$ -helix A are shown in yellow.

apo-form of myoglobin possesses a structure close to that of the holo-form (Loh et al. 1995; Eliezer and Wright 1996; Jamin and Baldwin 1998). The heme's largest effect on myoglobin structure is on the stability of the F  $\alpha$ -helix, which is much more flexible in the apo-form (Bernad et al. 2004). The folding reaction of aMb in solution has been studied in detail (Griko et al. 1988; Hughson et al. 1990; Barrick and Baldwin 1993; Kataoka et al. 1995; Gulotta et al. 2003; Jamin 2005). A partially folded state is detected during the pH-induced unfolding of aMb (Griko et al. 1988). At pH 6, the protein is folded and contains both secondary and tertiary structures, and it is unfolded at pH 2. The partially folded state, which contains secondary structures but no stable tertiary structure, is stabilized at pH 4. This state possesses the characteristics of the so-called molten globule state (Hughson et al. 1990). In this state, the  $\alpha$ -helices A, G, and H are already more stable than the others (Eliezer et al. 1998). The formation of a molten globule state is central in the membrane interactions of proteins with a globin fold. The stabilization of this partially folded state makes the hydrophobic regions of the protein accessible, and diminishes the energetic cost of the topology changes required for the interaction (van der Goot et al. 1991; Johnson and Cornell 1999; Chenal et al. 2002).

In the present work, we aimed to determine whether aMb interacts with membranes to extract heme from the lipid bilayer. We investigated the interaction of aMb with large unilamellar vesicles (LUVs), and measured the influence of aMb membrane binding on the rate of heme uptake. Our results show that all conditions favoring interactions of aMb with membrane destabilize its structure and decelerate the rate of heme binding. This suggests that, in cells, membrane interaction is not necessary for the final step of the myoglobin folding step, i.e., for holomyoglobin formation. The extraction of heme from the membrane is rather controlled by the greater affinity of the heme for myoglobin than for the lipid bilayer.

## Results

Myoglobin contains two tryptophans, which are both located in the N-terminal  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ A) (Fig. 1). The maximum emission wavelength of the intrinsic fluorescence spectrum ( $\lambda_{max}$ ), which is sensitive to the tryptophan (Trp) environment, has been used to monitor the pH-induced conformational changes and partitioning of aMb between buffer and LUVs. LUVs have been preferred to SUVs as models of membranes because they are more stable, and their curvature is closer to that of the membranes in cells (Lepore et al. 1992; Epanand 1998; Heerklotz and Epanand 2001; Bigay et al. 2003; Yoshida et al. 2004; Chenal et al. 2005). Figure 2 shows the pH dependence of  $\lambda_{max}$  for the protein in solution (triangles)



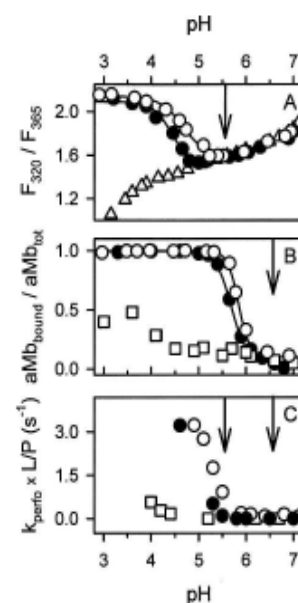
**Figure 2.** Changes in the maximum emission wavelength ( $\lambda_{\max}$ ) of the fluorescence emission spectrum as a function of the pH. aMb (1  $\mu\text{M}$ ) in the absence (triangles) or presence (circles) of  $\text{LUVs}$  (300  $\mu\text{M}$ ). Both experiments were performed in the presence of 30 mM NaCl.

and in the presence of anionic LUVs ( $\text{LUVs}$ ) (circles). In solution, we obtained the  $\lambda_{\max}$  values reported in the literature (Kirby and Steiner 1970; Postnikova et al. 1991; Jamin and Baldwin 1998; Gulotta et al. 2003). At neutral pH, the protein is in the native state, and  $\lambda_{\max}$  is around 330 nm, showing that the Trps located in the helix A are within a hydrophobic environment. As the pH decreases,  $\lambda_{\max}$  is shifted toward higher values. A first transition is observed between pH 7 and pH 4, leading to a value of  $\lambda_{\max}$  equal to 334 nm. During this first transition, the Trps become slightly more exposed to the solvent. The protein is then in the partially folded state at pH 4. This state, which has been extensively studied (Griko et al. 1988; Hughson et al. 1990; Barrick and Baldwin 1993; Kataoka et al. 1995; Eliezer et al. 1998, 2000; Kay and Baldwin 1998; Gulotta et al. 2003), contains native-like secondary structures but lacks tertiary structure. A second transition is observed between pH 4 and pH 2. It is related to the stabilization of the unfolded state of the protein at acidic pH (Griko et al. 1988). Then,  $\lambda_{\max}$  is around 344 nm, showing that the Trps are much more accessible to the solvent.

This pH dependence is quite different in the presence of  $\text{LUVs}$  (Fig. 2, circles). These experiments were carried out with a lipid/aMb ratio (L/P) equal to 300. The pH-dependencies were similar in solution and in the presence of LUVs (between pH 7 and pH 5.5), and diverged as the pH increased further. In the presence of  $\text{LUVs}$ , the decrease in  $\lambda_{\max}$  below pH 5 indicates that the Trps enter a more hydrophobic environment. The lowest value of  $\lambda_{\max}$  (327 nm) was observed for pH values around 3.7. An increase was observed for more acidic pH. The latter transition is due to the initiation of the release of protein from the membrane, which is also observed when the binding is monitored by centrifugation (data not shown). This release is correlated with the protonation of the head groups of egg phosphatidic acid (EPA) ( $\text{pK}_a = 2.9$ ), leading to the disappearance of the electrical charge on the surface of the membrane. Besides  $\lambda_{\max}$  measurements, the ratio between the fluorescence intensities at 325 nm and 365 nm ( $F_{325}/F_{365}$ ) was used to

monitor the fluorescence changes. Figure 3A (open circles) shows the pH dependence of the  $F_{325}/F_{365}$  ratio in the presence of  $\text{LUVs}$  at low ionic strength, the same conditions as in Figure 2. Both  $\lambda_{\max}$  and  $F_{325}/F_{365}$  ratio measurements display similar pH-dependence, with a large change between pH 5.2 and pH 3.5 in the presence of  $\text{LUVs}$  (Fig. 3A, open circles). The changes recorded with aMb in solution (Fig. 3A, open triangles), and in the presence of  $\text{LUVs}$  (Fig. 3A, open circles), seem to be superimposed for pHs ranging from 7.2 to 5.5.

In order to highlight the contribution of the electrostatic interactions to each step of the interactions between aMb and  $\text{LUVs}$ , we compared the pH dependence in the presence of 30 and 150 mM NaCl. Increase in ionic strength inhibits the electrostatic interactions and the penetration of Trps in a hydrophobic environment that occurs between pH 4.8 and pH 3 (Fig. 3A). To quantify the effect of the ionic strength, the pH dependence of the



**Figure 3.** Effects of charge and ionic strength on the interaction of aMb with LUVs as a function of pH. All experiments were carried out with a protein concentration equal to 1  $\mu\text{M}$ , in the absence of membrane (triangles), in the presence of  $\text{LUVs}$  (circles), or in the presence of  $\text{LUVs}$  (EPC only) (squares). Two ionic strengths were used: 30 mM NaCl (open symbols) and 150 mM NaCl (closed symbols). (A) Fluorescence intensity ratio ( $F_{320}/F_{365}$ ). The data obtained in the presence of LUVs (L/P is 300) were fitted using the Hill equation (continuous lines). (B) Partitioning experiments monitored by centrifugation (L/P = 300). The continuous lines are the best fits to the Hill equation. (C) Observed rate constants ( $k_{\text{permeo}}$ ) of LUV permeabilization by aMb. L/P ratios were equal to 350 and 400 for anionic and zwitterionic LUVs, respectively. The rate constants were normalized to the L/P ratio. To facilitate the comparisons between the various pH dependences, the beginning of the binding of aMb to  $\text{LUVs}$  monitored by centrifugation is marked by aligned arrows in B and C, and that of the conformation change detected by fluorescence by aligned arrows in A and C.

largest fluorescence change in the presence of lipid vesicles was fitted using the Hill equation (see Materials and Methods). At low ionic strength, the pH of the half transition ( $\text{pH}_{1/2}$ ) and the cooperativity ( $n_H$ ) were 4.65 and 1.8, respectively. At high ionic strength, the values were 4.4 for  $\text{pH}_{1/2}$  and 2.3 for  $n_H$ . According to the  $n_H$  values, at least two or three protons must bind cooperatively to induce the transition leading to the penetration of Trps in a hydrophobic environment. The shift of  $\text{pH}_{1/2}$  in the presence of a high concentration of NaCl highlights the electrostatic contributions to aMb membrane binding. For both ionic strengths, the conformation change of aMb in the presence of  $\text{LUVs}$  is fully reversible. The fluorescence spectrum of the soluble protein is recovered upon a pH-jump back to pH 7 (data not shown).

The binding of aMb to  $\text{LUVs}$  was also monitored by centrifugation experiments (Fig. 3B). The Trp fluorescence at 330 nm of the solution before and after centrifugation was used to determine the amount of protein pelleted together with  $\text{LUVs}$ . At low salt concentration (Fig. 3B, open circles), partition measurements indicated that aMb was completely bound to  $\text{LUVs}$  below pH 5.5. The binding is quite cooperative and occurs between pH 6.5 and pH 5.5. At pH 7, no binding was detected for lipid/protein molar ratios up to 2500 (data not shown). When the partition experiments as a function of pH were done in the presence of zwitterionic  $\text{LUVs}$  ( $\text{LUVs}^{\pm}$ ), only weak binding was detected around pH 3.5 (Fig. 3B, open squares). These results highlight the need for the electrostatic interactions between aMb and  $\text{LUVs}$ . Curve fitting of the data obtained in the presence of  $\text{LUVs}$  using the Hill equation gave the half transition pH ( $\text{pH}_{1/2}$ ) as 5.85 and the Hill number ( $n_H$ ) as 3.7. In the presence of 150 mM NaCl (Fig. 3B, closed circles), the pH dependence of the binding of aMb to  $\text{LUVs}$  was slightly shifted toward more acidic pH. Curve fitting indicated  $\text{pH}_{1/2} = 5.7$  and  $n_H = 2.6$  (Fig. 3B). Whatever the ionic strength of the solution, the binding of aMb to  $\text{LUVs}$  (Fig. 3B) occurs at more alkaline pH than the conformational change detected by fluorescence (Fig. 3A). At low ionic strength, for instance, the binding monitored by centrifugation occurs between pH 6.5 and pH 5.5, while the main fluorescence change is observed between pH 5.2 and pH 3.5. This is more obvious with the values of  $\text{pH}_{1/2}$ : there is a difference of more than one unit between the values obtained in the two experiments. Therefore, two steps can be distinguished in the interactions of aMb with  $\text{LUVs}$ : (1) membrane binding, and (2) penetration of the Trps in a hydrophobic environment. The cooperativity of the pH dependence ( $n_H > 1$ ) indicates that the cooperative binding of at least two or three protons to aMb is required for both steps.

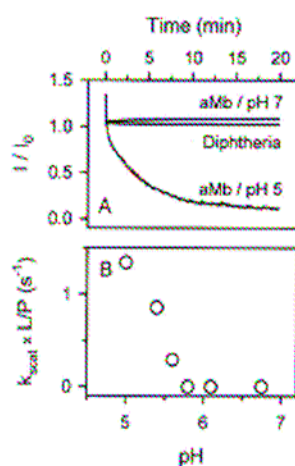
To evaluate the extent of destabilization of the lipid bilayer by aMb, we investigated the membrane perme-

abilization induced by aMb. This was monitored by the release of a fluorescent probe, pyranine, trapped inside the lipid vesicles. A quencher of pyranine fluorescence, DPX, was added to the buffer, and its effect was immediate. The fluorescence decay reflects the kinetics of pyranine release from  $\text{LUVs}$ . In experiments with anionic and zwitterionic  $\text{LUVs}$ , the L/P ratio was 350 and 400, respectively (Fig. 3C). The time dependence of pyranine release was fitted by a single exponential decay, and the rates given by the fitting procedure ( $k_{\text{perfo}}$ ) were normalized to the L/P molar ratio. At neutral and alkaline pH, when the protein does not interact with the lipid vesicles according to the fluorescence and partition experiments, no release of the pyranine was observed. At low NaCl concentration (Fig. 3C, open circles), membrane permeabilization was detected at pH values lower than 6, and the release rate increased as the pH decreased. At pH 5.5, i.e., the first pH at which membrane permeabilization was observed, the binding of aMb to  $\text{LUVs}$  was almost complete, while the second transition monitored by fluorescence had just started (Fig. 3, open circles). To facilitate comparisons between pH dependences, the beginning of the binding of aMb to  $\text{LUVs}$  monitored by centrifugation is marked by aligned arrows in Figure 3B and C, and the start of the conformation change detected by fluorescence by aligned arrows in Figure 3A and C. The start of the conformation change and the end of the first transition are roughly concomitant. Membrane permeabilization seems more linked to the second step of the interaction, i.e., the penetration of the Trp within a hydrophobic environment. This was confirmed in the presence of a high NaCl concentration. The onset of membrane permeabilization was shifted toward more acidic pH and started to be detectable from pH 5.3. At this pH, the binding monitored by centrifugation was complete, while the penetration of the Trps within a hydrophobic environment was ready to begin (Fig. 3, closed circles). Slight permeabilization was detected in the case of the  $\text{LUVs}^{\pm}$  (Fig. 3C, open squares), and was related to the partial binding detected by centrifugation (Fig. 3B, open squares).

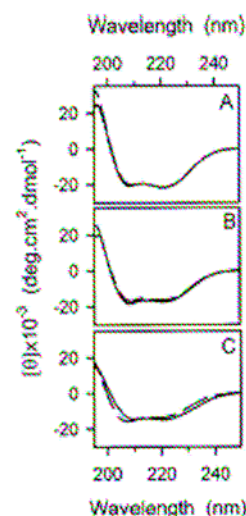
The L/P ratio required for membrane permeabilization by aMb (L/P  $\approx$  300) was much lower than that commonly used in the case of bacterial toxins (L/P  $\approx$  3000) (Chenal et al. 2002), indicating that more protein is necessary. The mechanism underlying membrane permeabilization by aMb may be either pore formation or lipid vesicle fragmentation (or micellization). The latter has been described by Lee and Kim (1992), whose electron microscopy experiments showed that micelles accumulate and form large complexes upon the addition of aMb to  $\text{LUVs}$ . This micellization can also induce the release of pyranine. Vesicle fragmentation decreases light scattering, which can be monitored (Lee and Kim 1992). The

translocation domain (dT) of diphtheria toxin was used for the control experiment (Fig. 4A). In conditions known to induce permeabilization of  $\lambda$ LUVs by dT ( $L/P = 3000$ ; 5 mM citrate buffer; pH 5; no NaCl) (Chenal et al. 2002), light scattering remained constant, showing that LUV permeabilization does not occur via a lysis mechanism. In these conditions, the normalized rate was  $2 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$  (Chenal et al. 2002), i.e., three orders of magnitude larger than the value observed for aMb (Fig. 3C). In the case of aMb, the protein was not bound to  $\lambda$ LUVs at neutral pH (Fig. 3B, circles), so no permeabilization occurred and the light scattering was unchanged, while addition of aMb at pH 5 reduced the scattered light intensity (Fig. 4A). The pH dependence of the rate of decay of scattered light was similar to that of the pyranine release (Figs. 3C, 4B). At a given pH, however, the rate was three times slower in the light scattering experiments. This suggests that the lipid bilayer is destabilized upon binding of aMb (leading to the LUV permeabilization), and micellization then occurs.

We used far-UV circular dichroism to probe the secondary structure changes involved in the interaction (Fig. 5). At pH 7, the spectrum of the native state in solution (Fig. 5A, dashed line) has minima around 222 nm and 208 nm, which are typical of a protein with an  $\alpha$ -helix content. In the presence of  $\lambda$ LUVs (Fig. 5A, continuous line), the spectrum was identical to the previous one, as expected, since the protein was not bound to LUVs in these conditions. At pH 5.5, the spectrum of the soluble form (Fig. 5B, dashed line) was still similar to that of the



**Figure 4.** Light scattering changes. (A) Light scattering was monitored by the ratio between the light intensity measured as a function of time and that before the addition of the protein ( $I/I_0$ ). Shown are the kinetics with aMb (1  $\mu\text{M}$ ;  $L/P = 350$ ) in the presence of 30 mM NaCl at pH 7 and pH 5, and with the translocation domain of the diphtheria toxin (100 nM;  $L/P = 3000$ ) at pH 5. (B) Observed rate constants of light scattering changes ( $k_{\text{obs}}$ ) as a function of pH.

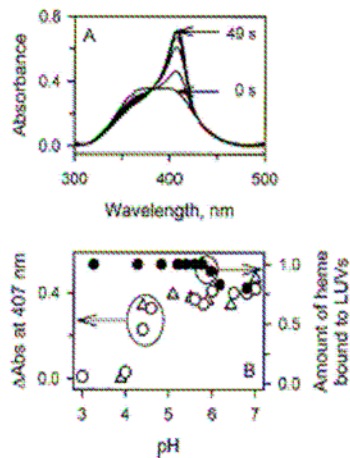


**Figure 5.** Far-UV CD spectra of aMb in the presence of  $\lambda$ LUVs at various pHs. (Dashed lines) aMb (2.5  $\mu\text{M}$ ) in solution. (Continuous lines) aMb (2.5  $\mu\text{M}$ ) in the presence of  $\lambda$ LUVs ( $L/P = 300$ ). (A) pH 7; (B) pH 5.5; (C) pH 4.

native state at pH 7. No significant change was observed in the spectrum recorded in the presence of  $\lambda$ LUVs (Fig. 5B, continuous line), despite a slight increase in intensity. At pH 4, small changes were observed in the spectrum of the protein in solution (Fig. 5C, dashed line). The minimum at 208 nm was slightly more pronounced than that at 222 nm. As reported in the literature, this effect might reflect a small decrease in helical content due to stabilization of a partially folded state of aMb at pH 4 (Griko et al. 1988; Hughson et al. 1990; Barrick and Baldwin 1993; Kataoka et al. 1995; Eliezer et al. 1998, 2000; Kay and Baldwin 1998). However, the helical content of the protein at pH 4 remains high and close to that of the native state. In the presence of  $\lambda$ LUVs (Fig. 5C, continuous line), the helical content increases slightly upon the binding of the protein to the membrane.

The results described above reveal that the aMb-membrane interaction is pH-dependent. In order to determine whether the membrane interaction is involved in heme uptake, we studied and compared the rate of heme incorporation at several pHs in the presence and absence of membrane. The combination of the heme with aMb, to form the holo-form of myoglobin, induces an enhancement of the Soret band at 407 nm of the heme absorbance spectrum (Fig. 6A). This effect can be used to monitor the extraction of the heme from the lipid bilayer by aMb. The absorbance spectrum of heme trapped in the lipid bilayer (Fig. 6A, 0 s) is close to that in solution (not shown). In our conditions, about 80% of the heme was bound to  $\lambda$ LUVs at pH 7 and 100% for pHs lower than 6 (Fig. 6B, closed circles). The binding of heme to aMb was





**Figure 6.** (A) The effect of the binding to aMb on the absorbance spectrum of heme is illustrated with absorbance spectra recorded during the heme uptake at pH 5.6 in the presence of LUVs. The spectrum at "0 s" corresponds to the heme incorporated in LUVs in a preliminary step. The intensity of the Soret band at 407 nm increased upon uptake by myoglobin (spectrum at "49 s"). (B) Amount of heme (closed circles) bound to LUVs as a function of pH (lipid/heme = 40) monitored by centrifugation. Binding of heme (open circles) to aMb (3  $\mu$ M) in the presence of LUVs (aMb/heme = 1 and lipid/aMb = 40) monitored by the variation in the absorbance at 407 nm. Binding of heme (open triangles) to aMb (3  $\mu$ M) in the absence of LUVs (aMb/heme = 1). The arrows indicate the axis corresponding to the dependences.

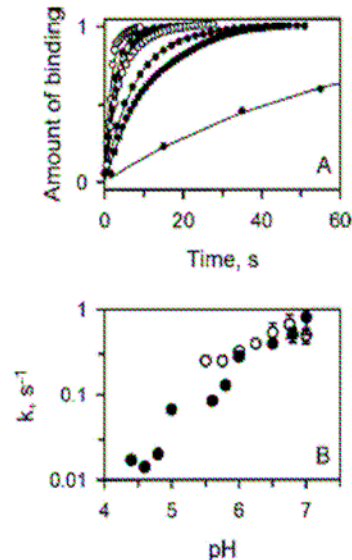
observed up to pH 5 and vanished at pH 4, either in the absence or presence of LUVs (Fig. 6B, open symbols). The presence of membrane had no significant effect on the pH dependence of the amount of heme binding. For the experiments in the presence of LUVs, the heme to aMb concentration ratio was 1. Therefore, even at pH 7, when about 20% of heme remains in solution, most of the heme bound to myoglobin was trapped in the lipid bilayer before binding. This is also true for the kinetic experiments described below.

The trapping of heme in the membrane has no effect on the amount of holomyoglobin formed. To investigate a possible effect on the mechanism of heme uptake, we monitored the kinetics of binding in the presence and absence of LUVs (Fig. 7). The pH range of the investigation was 7–4.4 in the presence of LUVs, and 7–5.5 in the absence of membrane. Difficulties in heme handling impair the experiments at lower pH in the absence of LUVs. Examples of heme binding kinetics are shown in Figure 7A, and the pH dependence of the binding rate is illustrated in Figure 7B. Within the pH range explored in solution, heme binding is quite fast (finished within 20 sec) (Fig. 7A, open circles) and weakly sensitive to pH (Fig. 7B, open circles). The kinetics are more sensitive to pH changes in the presence of LUVs (Fig. 7, closed circles). Between pH 7 and pH 6, the heme binding rates

were similar in the presence and absence of membranes (Fig. 7B). Below pH 6, the binding became significantly slower in the presence of LUVs (Fig. 7B). This suggests that the binding of aMb to LUVs, which starts around pH 6 (Fig. 3B, open circles), decelerates the heme uptake. Up to pH 4.5, the reaction further slows down as the interaction of aMb with the lipid bilayer becomes tighter (Fig. 7B, closed circles). The pH dependence of the rate seems to plateau around pH 5, which is the pH intermediate between the two steps of the interaction of aMb with LUVs described earlier (Figs. 3A,B). This suggests that a first deceleration of the heme uptake occurs upon the binding of aMb to LUVs (Figs. 3B,7B), and that the conformation change, which leads to the burying of the Trps in a highly hydrophobic environment (Figs. 2,3A), further slows down the heme uptake (Fig. 7B).

## Discussion

We report here an exhaustive study of the interactions of apomyoglobin (aMb) with lipid vesicles. We show that aMb interacts with LUVs under acidic conditions, and that the presence of negatively charged phospholipids is required. Our results differ from those reported by Basova and colleagues (2004). They have shown that aMb interacts with lipid bilayers at neutral pH. The



**Figure 7.** (A) Kinetics of heme uptake by apomyoglobin. The conditions are the same as in Figure 6. Kinetics (open circles) in the absence of LUVs: The fastest kinetics were recorded at pH 6.5 and the slowest at pH 5.5. Kinetics (closed circles) in the presence of LUVs: From the fastest to the slowest kinetics, the pHs are 6.5, 6.0, 5.8, 5.6, and 4.4. The continuous lines correspond to the best fits of a single exponential decay. (B) pH dependences of the rate of the heme uptake in the absence of LUVs (open circles) and in the presence of LUVs.

discrepancy probably arises from the use by these authors of SUV, sonicated lipid vesicles, which are characterized by a higher curvature, favoring hydrophobic effects within the solvent-membrane interface (Lepore et al. 1992; Heerklotz and Epanand 2001; Chenal et al. 2005). This difference in behavior of aMb in the presence of lipid vesicles of various curvatures highlights that protein membrane interactions are governed by subtle electrostatic and hydrophobic effects.

Two steps can be distinguished in the pH dependence of the interactions. The first step is monitored by partition experiments, and can be related to the binding of the protein to the lipid bilayer (Fig. 3B). The second step is associated with the penetration of the Trps into a more hydrophobic environment (Figs. 2,3A), and to the permeabilization of the lipid vesicles (Fig. 3C). These observations suggest tighter interactions between the protein and the membrane upon this second step. According to the work of Lee and Kim (1992), in conditions similar to those used here, the membrane permeabilization is due to the fragmentation of the lipid vesicles and the formation of large complexes. In these complexes the lipids are still organized in a bilayer (Lee and Kim 1992). In the presence of  $\tau$ LUVs, the secondary structure of aMb remains native-like over the whole pH range favorable to the binding (Fig. 5). The parallel between the stabilization in solution of the partially folded state at pH 4 and the penetration of the Trps within a hydrophobic environment suggests that the loss of the tertiary structure of the protein is necessary at that stage of the membrane interaction. The stabilization of such a state, with native-like secondary structure but without tertiary structure, is generally related to the interaction of amphitropic proteins with membranes (van der Goot 1991; Zhan et al. 1994, 1995; Zakharov et al. 1998; Chenal et al. 2002). In the present case, however, we have no direct evidence for the destabilization of the tertiary structure; the weak amplitude of the near-UV CD spectrum of apomyoglobin and the scattering due to the lipid vesicles impede monitoring of the tertiary structure.

Apomyoglobin shares some characteristics of amphitropic proteins with a globin fold, such as bacterial toxin domains (Holm and Sander 1993a,b). Its interactions with lipid bilayers are pH-sensitive and require the presence of anionic phospholipids (Parker and Feil 2005). Moreover, they are linked to the stabilization of a partially folded state, which has the characteristics of a molten globule state. More particularly, the pH dependence of the interactions of aMb with  $\tau$ LUVs (Fig. 3) presents striking similarities with that of the translocation domain of diphtheria toxin (Chenal et al. 2002). For both proteins, two steps can be distinguished. The first corresponds to the binding to the lipid bilayer, and the second to the membrane permeabilization. In both cases, the second step is

related to the penetration of Trps within a hydrophobic environment. Concerning the translocation domain of diphtheria toxin, it has been proposed that this movement of the Trps is due to a movement of the amphiphilic N-terminal  $\alpha$ -helices within the membrane interface (Chenal et al. 2002). As the pH decreases, the acidic side chains become protonated and lose their negative charges. Then, at acidic pH, the interaction of this amphiphilic  $\alpha$ -helix with the lipid bilayer results from electrostatic attractions between basic side chains and anionic headgroups of phospholipids, and from hydrophobic interactions (Chenal et al. 2002). As a consequence, the hydrophobic face of the helix, where one of the two Trps of the domain is located, penetrates deeper into the hydrophobic core of the lipid bilayer. A similar behavior can be proposed for the N-terminal  $\alpha$ -helix of aMb, which contains the two Trps of the protein. This helix also contains three glutamates, which can be protonated at acidic pH and lose their charge. Then, the helix can penetrate the hydrophobic core of the membrane, together with the Trps. Hence, a similar behavior is found for two proteins of different functions. This highlights how the pH can regulate the position, within the membrane interface, of amphiphilic  $\alpha$ -helices of amphitropic proteins in a way similar to that described for antibacterial peptides (Falnes et al. 1992; Leenhouts et al. 1995; Liu and Deber 1997). This effect of the pH on amphitropic proteins is probably essential for the regulation of their function. Overall, these results also indicate that aMb behaves like other proteins of the globin fold family. Although these proteins have evolved toward divergent functions, they have preserved an ancestral intrinsic propensity to interact with membrane, suggesting that the globin fold is a structural platform well adapted to functions requiring an amphitropic character.

An evident role for the interaction of aMb with lipid bilayers would be to facilitate the uptake of heme from the outer mitochondrial membrane. However, heme binding to aMb is observed at neutral pH when the protein remains in solution, and slows down as the pH becomes more favorable to membrane interactions (Fig. 7). At neutral pH, the heme initially incorporated within the membranes of LUVs is transferred to myoglobin within a few seconds. This suggests that heme has a greater affinity for apomyoglobin than for the lipid bilayer. The heme uptake becomes slower for pHs between 6 and 5.5, when aMb starts to bind to  $\tau$ LUVs. A possible explanation for this effect is that the affinity of heme for the lipid bilayer becomes greater as the pH decreases. In that case, however, the decrease in the uptake rate should start earlier, because improved heme binding to LUVs is already observed between pH 7 and pH 6 (Fig. 6B), and, obviously, this is not the case (Fig. 7B). The effect of the LUVs on the heme uptake seems more related to the binding of aMb to the membranes. While the protein in

solution is mostly native around pH 6–5.5, the fact that its binding to the membrane slows down the heme uptake raises the question of the structure of the membrane-bound protein. There are two possibilities upon binding of the protein to heme-loaded LUVs: (1) the protein remains in a mostly native-like state, but the heme binding site is not available, or (2) membrane interaction induces unfolding of aMb, and, consequently, the heme binding site is destabilized. The fact that no change is detected by spectroscopy (fluorescence and far-UV CD) suggests that the first possibility is the right one. However, the second possibility cannot be completely excluded. At this stage, we can only conclude that heme binds to aMb in solution.

At least *in vitro*, the interaction of aMb with the membrane is not necessary for heme uptake, and in fact, it decelerates the process. *In vivo*, however, it is possible that, within the crowded cytoplasm of a cell (van den Berg et al. 2000), the interaction with mitochondria membranes increases the probability of heme uptake by aMb. Hence, the amphitropic character would drive aMb in the vicinity of the membrane, favoring its folding reaction. However, the amphitropic character of myoglobin seems necessary to accomplish at least one of its physiological functions, the release by the holo-form of O<sub>2</sub> to the outer mitochondrial membrane.

## Materials and methods

### Protein expression and purification

A synthetic gene for sperm whale apomyoglobin (aMb) was expressed and purified as described (Weisbuch et al. 2005). Protein concentration was determined by absorbance in 6 M guanidinium chloride using  $\epsilon_{280\text{nm}} = 15,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  and  $\epsilon_{288\text{nm}} = 10,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . The recombinant T domain of diphtheria toxin (dT) was expressed and purified as described previously (Chenal et al. 2002).

### Preparation of large unilamellar vesicles (LUVs)

Vesicles were prepared at a concentration of 20 mM in 4 mM citrate buffer either with 30 mM NaCl or 150 mM NaCl by reverse phase evaporation. Anionic LUVs (LUVs) were constituted from egg phosphatidic acid (EPA) and egg phosphatidyl choline (EPC) (Avanti Polar Lipids) at 1:9 molar ratio. Zwitterionic LUVs (LUVs) were prepared from EPC only. The monodispersity and size of LUVs (mean hydrodynamic diameter = 150 nm) were checked by a Zetasizer 3000 instrument (10 mV HeNe laser at 632.8 nm) (Malvern Instruments).

### Buffers

All experiments were done in 4 mM citrate buffer and either 30 mM NaCl or 150 mM NaCl at 22°C. The protein was kept in pure water and was diluted in a range of buffers of various pHs. The pH of diluted protein was checked after spectroscopic measurements.

### Fluorescence spectroscopy

Fluorescence was measured using a FP-6500 spectrofluorimeter (Jasco). The measurements were made in a thermostated cell holder, using a 1-cm pathlength and 3-mL quartz cell. The bandwidth was 3 nm for both excitation and emission beams. The excitation wavelength was fixed at 280 nm. Maximal emission wavelength ( $\lambda_{\text{max}}$ ) and fluorescence intensity ratio at 325 and 365 nm ( $F_{325}/F_{365}$ ) were obtained by averaging three scans collected over a 300–450 nm range using 1-nm steps and a scan rate of 100 nm · min<sup>-1</sup>. Samples were constantly stirred. Background spectra were collected using the same buffer and lipid concentration. The protein concentration was 1  $\mu\text{M}$  and the lipid/protein molar ratio (L/P) was equal to 300, unless stated otherwise.

### Partitioning of aMb to LUVs monitored by centrifugation

The ratio L/P was equal to 300 and the aMb concentration 1  $\mu\text{M}$ . Trp fluorescence was used as the probe of protein concentration. Vesicles were prepared with 0.5% of NBD-phosphatidyl ethanolamine (NBD-PE) (N-360, Molecular Probes). LUVs and proteins were incubated in 5 mL for 2 h at room temperature. Samples were centrifuged in a Beckman L-70 ultracentrifuge using a Ti 70.1 rotor at 4°C for 1.5 h with a speed of 62,000 rpm (265,000g). The efficiency of LUV pelleting was checked by measuring the NBD-PE fluorescence (excitation wavelength: 464 nm, emission: 500–600 nm) before and after centrifugation (supernatant). All experiments were also done without LUVs to check the sedimentation of the soluble aMb. The fraction of partitioned or pelleted aMb ( $f_{\text{pel}}$ ) was determined as follows:  $f_{\text{pel}} = (F_0 - F)/F_0$ , where  $F_0$  and  $F$  are the fluorescence intensities of aMb at 330 nm before and after centrifugation, respectively.

### Curve fitting

The pH dependences of the interactions of aMb with LUVs, monitored by either fluorescence ( $F_{325}/F_{365}$ ) or centrifugation, were fitted using the Hill equation as follows:  $P = P_i + (P_f - P_i)/(1 + (K/H)^{n_H})$ , where  $P$  is the measured parameter ( $F_{325}/F_{365}$  or  $f_{\text{pel}}$ ),  $P_f$  and  $P_i$  are the final and initial values, respectively,  $H$  is the proton concentration ( $H = 10^{-\text{pH}}$ ),  $K$  is the dissociation constant or  $\text{pH}_{1/2}$ , and  $n_H$  is the Hill coefficient. In the case of the fluorescence measurements, only the data within the pH range of the largest changes were considered for the fit (pH 5.5–3).

### Lipid vesicle permeabilization assay

Experiments were performed as described previously (Chenal et al. 2002). The final concentration of aMb was 1  $\mu\text{M}$ . In order to get an optimal signal (magnitude and experiment time) with lipid-saturated conditions, the L/P ratio was equal to either 350 for anionic LUVs or 400 for zwitterionic LUVs. The observed rate constants ( $k_{\text{perfo}}$ ) were normalized to the L/P molar ratio.

### Light scattering experiments

The experiments were carried out with anionic LUVs only. The aMb concentration was 1  $\mu\text{M}$  in citrate buffer containing 30 mM

or 150 mM NaCl. Control experiments with diphtheria toxin translocation domain used the same conditions as Chenal et al. (2002), i.e., 5 mM citrate buffer and without NaCl. Both excitation and emission wavelengths were set to 600 nm and the sample was continuously stirred. Kinetics were initiated by addition of the protein to the LUVs solution. The final concentrations were either 1  $\mu\text{M}$  of aMb with L/P = 350 or 100 nM of diphtheria toxin domain with L/P = 3000. The observed rate constants ( $k_{\text{obs}}$ ) were normalized to the L/P molar ratio.

#### Circular dichroism spectropolarimetry

CD experiments were performed on a JASCO J-810 spectropolarimeter (Jasco). An average of 30 scans was recorded in the far-UV between 190 and 250 nm at 50 nm  $\cdot$  min $^{-1}$ , using 1 nm resolution steps and a bandwidth of 4 nm. The pathlength was 1 mm. CD spectra were recorded for aMb in solution and in the presence of LUVs. The protein concentration was 2.5  $\mu\text{M}$  in both experiments and the L/P ratio was equal to 300. A low concentration of protein was used in order to minimize LUV-induced light scattering. All spectra were baseline-corrected and then the Savitzky-Golay smoothing algorithm was used with a window width of five values in the Jasco spectra analysis software.

#### Partitioning of heme to LUVs monitored by centrifugation

The ratio LUV/heme was equal to 40 and the heme concentration 3  $\mu\text{M}$ . Vesicles were prepared and incubated in 4 mL for 30 min with heme at room temperature. Samples were centrifuged in a Beckman L-70 ultracentrifuge using a Ti 70.1 rotor for 1.5 h at a speed of 62,000 rpm (265,000g). Absorbance spectra (300–500 nm) were recorded before and after centrifugation (supernatant) with a Hewlett-Packard 8453 photodiode array instrument. Control experiments were also done without heme in order to take account of vesicle diffusion (before centrifugation). The fraction of heme bound to vesicles ( $f_{\text{hb}}$ ) was determined as follows:  $f_{\text{hb}} = (A_0 - A)/A_0$ , where  $A_0$  and  $A$  are the absorbencies of heme at 408 nm before and after centrifugation, respectively.

#### Heme uptake kinetics

The protocol used for these experiments was adapted from that of Olson and colleagues (Rose and Olson 1983; Rose et al. 1985). Heme was solubilized at a concentration of 400  $\mu\text{M}$  in 10 mM NaOH. LUVs (120  $\mu\text{M}$ ) were loaded with heme at a final concentration of 3  $\mu\text{M}$  (lipid/heme = 40). The heme uptake kinetics were initiated by adding aMb (3  $\mu\text{M}$ ) (aMb/heme = 1 and lipid/aMb = 40). Absorbance spectra (300–500 nm) were recorded during the kinetics of heme uptake with a Hewlett-Packard 8453 photodiode array instrument. Control experiments of heme uptake by aMb in the absence of vesicles were performed using the same concentrations (3  $\mu\text{M}$  aMb/3  $\mu\text{M}$  heme). In order to avoid heme precipitation at acidic pH, heme uptake kinetics in solution were initiated by adding a small volume of heme solution at alkaline pH to a solution of aMb at a pH adjusted in order to get the right pH upon mixing. Absorbance spectra were then recorded as described above. A baseline correction was applied to the spectra in order to take into account the light scattering due to the lipid vesicles. The

aMb/heme ratio used was always equal to 1, and we checked by chromatography that heme was fully bound to myoglobin at pH 7.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Commissariat à l'Énergie Atomique (Programme: Protéines Membranaires).

#### References

- Barrick, D. and Baldwin, R.L. 1993. Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding. *Biochemistry* 32: 3790–3796.
- Bacova, L.V., Tiktopols, E.I., Kashparov, I.A., and Bychkova, V.E. 2004. Conformational state of apomyoglobin in the presence of phospholipid vesicles at neutral pH. *Mol. Biol. (Mosk)* 38: 323–332.
- Bennet, M.J., Choe, S., and Eisenberg, D. 1994. Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Sci.* 3: 1444–1463.
- Bernad, S., Oellerich, S., Soulimane, T., Noinville, S., Baron, M.H., Paternoste, M., and Lecomte, S. 2004. Interaction of horse heart and thermus thermophilus type c cytochromes with phospholipid vesicles and hydrophobic surfaces. *Biophys. J.* 86: 3863–3872.
- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S., and Antony, B. 2003. Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* 426: 563–566.
- Cannon, J.B., Kua, F.S., Pasternack, R.F., Wong, N.M., and Muller-Eberhard, U. 1984. Kinetics of the interaction of hemin liposomes with heme binding proteins. *Biochemistry* 16: 3715–3721.
- Chenal, A., Savarin, P., Nizard, P., Guillaud, F., Gillet, D., and Forge, V. 2002. Membrane protein insertion regulated by bringing electrostatic and hydrophobic interactions into play. A case study with the translocation domain of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 277: 43425–43432.
- Chenal, A., Vernier, G., Savarin, P., Bushmarina, N.A., Geze, A., Guillaud, F., Gillet, D., and Forge, V. 2005. Conformational states and thermodynamics of  $\alpha$ -lactalbumin bound to membranes: A case study of the effects of pH, calcium, lipid membrane curvature and charge. *J. Mol. Biol.* 349: 890–905.
- Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M., Kantardjiev, K.A., Collier, R.J., and Eisenberg, D. 1992. The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* 357: 216–222.
- Duiley, H.A. 2002. Terminal steps of haem biosynthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 4: 590–595.
- Eliezer, D. and Wright, P.E. 1996. Is apomyoglobin a molten globule? Structural characterization by NMR. *J. Mol. Biol.* 263: 531–538.
- Eliezer, D., Yao, J., Dyson, H.J., and Wright, P.E. 1998. Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding. *Nat. Struct. Biol.* 5: 148–155.
- Eliezer, D., Chung, J., Dyson, H.J., and Wright, P.E. 2000. Native and non-native secondary structure and dynamics in the pH 4 intermediate of apomyoglobin. *Biochemistry* 39: 2894–2901.
- Epand, R.F. 1998. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1376: 353–368.
- Falnes, P.O., Madhus, I.H., Sandvig, K., and Olsnes, S. 1992. Replacement of negative by positive charges in the presumed membrane-inserted part of diphtheria toxin B fragment. Effect on membrane translocation and on formation of cation channels. *J. Biol. Chem.* 267: 12284–12290.
- Ferreira, G.C. 1999. Ferrochelatase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 10: 995–1000.
- Fesik, S.W. 2000. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103: 273–282.
- Griko, Y.V., Privalov, P.L., Venyaminov, S.Y., and Kutyschenko, V.P. 1988. Thermodynamic study of the apomyoglobin structure. *J. Mol. Biol.* 202: 127–138.
- Gulotta, M., Rogatsky, E., Callender, R.H., and Dyer, R.B. 2003. Primary folding dynamics of sperm whale apomyoglobin: Core formation. *Biophys. J.* 84: 1909–1918.
- Heerklotz, H. and Epand, R.F. 2001. The enthalpy of acyl chain packing and the apparent water-accessible apolar surface area of phospholipids. *Biophys. J.* 80: 271–279.
- Holm, L. and Sander, C. 1993a. Globin fold in a bacterial toxin. *Nature* 361: 309.
- Holm, L. and Sander, C. 1993b. Structural alignment of globins, phycoerythrins and colicin A. *FEBS Lett.* 315: 301–306.
- Hughson, F.M., Wright, P.E., and Baldwin, R.L. 1990. Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. *Science* 249: 1544–1548.

- Jakoby, W.B. 1978. The glutathione S-transferases: A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 46: 383–414.
- Jamin, M. 2005. The folding process of apomyoglobin. *Protein Pept. Lett.* 3: 229–234.
- Jamin, M. and Baldwin, R.L. 1998. Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* 276: 491–504.
- Johnson, J.E. and Comell, R.B. 1999. Amphitropic proteins: Regulation by reversible membrane interactions. *Mol. Membr. Biol.* 16: 217–235.
- Kataoka, M., Nishii, I., Fujisawa, T., Ueki, T., Tokunaga, F., and Goto, Y. 1995. Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* 249: 215–228.
- Kay, M.S. and Baldwin, R.L. 1998. Alternative models for describing the acid unfolding of the apomyoglobin folding intermediate. *Biochemistry* 37: 7859–7868.
- Kirby, E.P. and Steiner, R.F. 1970. The tryptophan microenvironments in apomyoglobin. *J. Biol. Chem.* 245: 6300–6306.
- Lee, J.W. and Kim, H. 1992. Fragmentation of dimyristoylphosphatidylcholine vesicles by apomyoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 297: 354–361.
- Leenhouts, J.M., van den Wijngaard, P.W., de Kroon, A.I., and de Kruijff, B. 1995. Anionic phospholipids can mediate membrane insertion of the anionic part of a bound peptide. *FEBS Lett.* 370: 189–192.
- Lepore, L.S., Ellena, J.F., and Cafiso, D.S. 1992. Comparison of the lipid acyl chain dynamics between small and large unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 61: 767–775.
- Light 3rd, W.R. and Olson, J.S. 1990. Transmembrane movement of heme. *J. Biol. Chem.* 265: 15623–15631.
- Liu, L.P. and Deber, C.M. 1997. Anionic phospholipids modulate peptide insertion into membranes. *Biochemistry* 36: 5476–5482.
- Loh, S.N., Kay, M.S., and Baldwin, R.L. 1995. Structure and stability of a second molten globule intermediate in the apomyoglobin folding pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 5446–5450.
- Parker, M.W. and Feil, S.C. 2005. Pore-forming protein toxins: From structure to function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 88: 91–142.
- Parker, M.W., Patrus, F., Tucker, A.D., and Tsemoglou, D. 1989. Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* 337: 93–96.
- Postnikova, G.B., Komarov, Y.E., and Yumakova, E.M. 1991. Fluorescence study of the conformational properties of myoglobin structure. I. pH-dependent changes of tryptophanyl fluorescence in intact and chemically modified sperm whale apomyoglobins. *Eur. J. Biochem.* 198: 223–232.
- Rose, M.Y. and Olson, J.S. 1983. The kinetic mechanism of heme binding to human apohemoglobin. *J. Biol. Chem.* 258: 4298–4303.
- Rose, M.Y., Thompson, R.A., Light, W.R., and Olson, J.S. 1985. Heme transfer between phospholipid membranes and uptake by apohemoglobin. *J. Biol. Chem.* 260: 6632–6640.
- Szebeni, J., Di Iorio, E.E., Hauser, H., and Winterhalter, K.H. 1985. Encapsulation of hemoglobin in phospholipid liposomes: Characterization and stability. *Biochemistry* 24: 2827–2832.
- Szebeni, J., Hauser, H., Eskelson, C.D., Watson, R.R., and Winterhalter, K.H. 1988. Interaction of hemoglobin derivatives with liposomes. Membrane cholesterol protects against the changes of hemoglobin. *Biochemistry* 27: 6425–6434.
- van den Berg, B., Wain, R., Dobson, C.M., and Ellis, R.J. 2000. Macromolecular crowding perturbs protein refolding kinetics: Implications for folding inside the cell. *EMBO J.* 19: 3870–3878.
- van der Goot, F.G., Gonzalez-Manas, J.M., Lakey, J.H., and Pattux, F. 1991. A "molten-globule" membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* 354: 408–410.
- Weisbuch, S., Gerard, F., Pasdeloup, M., Cappadoro, J., Dupont, Y., and Jamin, M. 2005. Cooperative sub-millisecond folding kinetics of apomyoglobin pH 4 intermediate. *Biochemistry* 44: 7613–7623.
- Wittenberg, J.B. and Wittenberg, B.A. 2003. Myoglobin function reassessed. *J. Exp. Biol.* 206: 2011–2020.
- Yoshida, Y., Kinuta, M., Abe, T., Liang, S., Amaki, K., and Cremona, O. 2004. The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J.* 23: 3483–3491.
- Zakharov, S.D., Lindeberg, M., Griko, Y., Salamon, Z., Tollin, G., Prendergast, F.G., and Cramer, W.A. 1998. Membrane-bound state of the colicin E1 channel domain as an extended two-dimensional helical array. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 4282–4287.
- Zhan, H., Choe, S., Huynh, P.D., Finkelstein, A., Eisenberg, D., and Collier, R.J. 1994. Dynamic transitions of the transmembrane domain of diphtheria toxin: Disulfide trapping and fluorescence proximity studies. *Biochemistry* 33: 11254–11263.
- Zhan, H., Oh, K.J., Shin, Y.K., Hubbell, W.L., and Collier, R.J. 1995. Interaction of the isolated transmembrane domain of diphtheria toxin with membranes. *Biochemistry* 34: 4856–4863.

**JMB**Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect



## Defining the Interacting Regions between Apomyoglobin and Lipid Membrane by Hydrogen/Deuterium Exchange Coupled to Mass Spectrometry

Petr Man<sup>1</sup>, Caroline Montagner<sup>2</sup>, Grégory Vernier<sup>2</sup>, Bernard Dublet<sup>1</sup>  
Alexandre Chenal<sup>2</sup>, Eric Forest<sup>1\*</sup> and Vincent Forge<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse des Protéines  
Institut de Biologie Structurale  
(CEA-CNRS-UJF)  
41 rue Jules Horowitz  
38027 Grenoble, France

<sup>2</sup>CEA; DSV; iRTSV  
Laboratoire de Chimie et  
Biologie des Métaux  
(UMR 5249); CEA-Grenoble  
17 rue des martyrs  
38054 Grenoble, France

Sperm whale myoglobin can be considered as the model protein of the globin family. The pH-dependence of the interactions of apomyoglobin with lipid bilayers shares some similarities with the behavior of pore-forming domains of bacterial toxins belonging also to the globin family. Two different states of apomyoglobin bound to a lipid bilayer have been characterized by using hydrogen/deuterium exchange experiments and mass spectrometry. When bound to the membrane at pH 5.5, apomyoglobin remains mostly native-like and interacts through  $\alpha$ -helix A. At pH 4, the binding is related to the stabilization of a partially folded state. In that case,  $\alpha$ -helices A and G are involved in the interaction. At this pH,  $\alpha$ -helix G, which is the most hydrophobic region of apomyoglobin, is available for interaction with the lipid bilayer because of the loss of the tertiary structure. Our results show the feasibility of such experiments and their potential for the characterization of various membrane-bound states of amphitropic proteins such as pore-forming domains of bacterial toxins. This is not possible with other high-resolution methods, because these proteins are usually in partially folded states when interacting with membranes.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\*Corresponding authors

**Keywords:** apomyoglobin; amphitropic proteins; protein/membrane interactions; H/D exchange; mass spectrometry

### Introduction

The structure of proteins inserted in biological membranes is determined by the fine coupling between the energy of the protein folding and that of the polypeptide partitioning into membranes. Some soluble proteins, the so-called amphitropic proteins, can switch from a soluble to a membrane-bound state for their biological activities.<sup>1</sup> Such

proteins are excellent models to provide insight into the interactions between proteins and membranes. Some amphitropic proteins belong to the globin family, which is characterized by a specifically assembled group of six to ten  $\alpha$ -helices.<sup>2,3</sup> The globin fold can be found in bacterial toxins, such as the translocation domain of diphtheria toxin,<sup>4,5</sup> pore-forming domains of colicins,<sup>2,6</sup> as well as members of the Bcl-2 family that play an important role in the regulation of the apoptosis.<sup>7–9</sup> For these proteins, formation of a partially folded state is required for their insertion within the membranes.<sup>10–12</sup> This is the so-called molten globule, characterized by a large amount of secondary structure but lacking stable tertiary structure. Formation of this state makes the hydrophobic  $\alpha$ -helices available for interactions with the lipid bilayer.

The globin fold was described originally for myoglobin, a member of the globin family involved in the intracellular transport of oxygen in various organisms. Sperm whale myoglobin is a 153 amino acid residue protein containing eight  $\alpha$ -helices designated A to H.<sup>13</sup> This is the most studied and

Present address: A. Chenal, Unité de Biochimie des Interactions Macromoléculaires, URA 2185, Département de Biologie Structurale et Chimie, Institut Pasteur, 25-28, rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

Abbreviations used: aMb, sperm whale apomyoglobin; EPA, egg phosphatidic acid; EPC, egg phosphatidylcholine; H/D, hydrogen/deuterium; LUV, large unilamellar vesicle;  $\bar{L}$ UV, anionic LUV; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization.

E-mail addresses of the corresponding authors: [eric.forest@ibs.fr](mailto:eric.forest@ibs.fr); [vincent.forge@cea.fr](mailto:vincent.forge@cea.fr)

the best known member of the globin family. Its unfolding/refolding reaction has been studied in detail,<sup>14-18</sup> more particularly, the partially folded states stabilized under acidic conditions.<sup>19,20</sup> Within the molten globule state observed around pH 4 and formed during the fastest steps of the folding reaction, the  $\alpha$ -helices A, G and H are already stabilized and have native-like interactions between each other.<sup>21</sup> Interactions of apomyoglobin (aMb) with membranes have been reported.<sup>22,23</sup> The interactions of aMb with large unilamellar vesicles (LUVs) are pH-dependent and require the presence of anionic phospholipids.<sup>24</sup> Two steps can be distinguished in the pH-dependence of the interactions. The protein binds to the lipid vesicles in a first step, for pH values still propitious to the native state (pH 5.5). This binding is detected in partition experiments but not by spectroscopy (fluorescence and circular dichroism), suggesting that the protein does not undergo a large change of conformation during this step. However, the binding of heme is decelerated, implying that the heme-binding site is unavailable when aMb is in interaction with lipid bilayers. The second step occurs at a more acidic pH (4) and is related to the penetration of the tryptophan (Trp) side-chains within a hydrophobic environment. At that stage, the interactions of aMb with the lipid bilayer are tighter and induce the fragmentation of the LUVs. Therefore, two well-defined states of aMb can be distinguished in the pH-dependence of the interactions with LUVs. At pH 5.5, the protein is superficially bound to the lipid bilayer. Although no change in the structure of the protein is detected by spectroscopy, the binding site of heme is not available in that state. At pH 4, the tryptophan residues, both located in  $\alpha$ -helix A, have penetrated into a hydrophobic environment and the interaction of the protein with the membrane is tighter than that at pH 5.5.

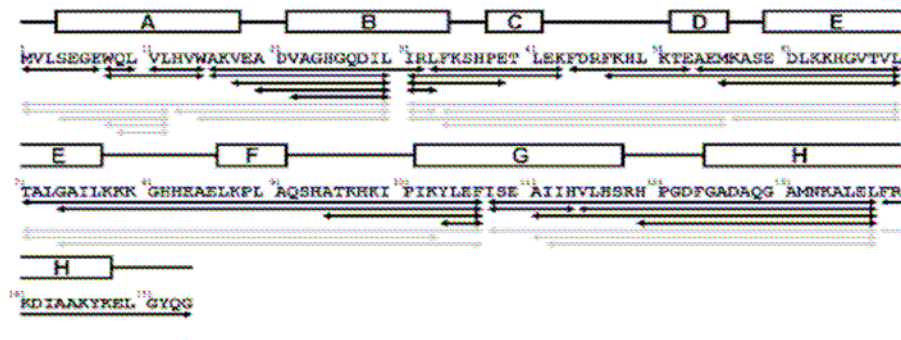
Hydrogen/deuterium (H/D) exchange experiments provide information on the local stability of proteins. Their coupling with nuclear magnetic resonance (NMR) or mass spectrometry (MS) has been particularly valuable in characterizing the struc-

ture of partially folded states of protein during a folding reaction.<sup>25-30</sup> H/D exchange experiments associated with NMR have been performed on amphitropic proteins interacting with membranes.<sup>31-33</sup> These experiments have allowed the localization of the interacting region of the protein at the single residue level. It has also been possible to characterize different conformations of a protein bound to lipid vesicles of various sizes. However, the use of these protocols is limited to only a small number of proteins. In order to record the NMR spectra and monitor H/D exchange at the single residue level, the interaction must be reversed and the protein must recover its soluble native state. This is possible only for proteins with a cofactor that stabilizes their tertiary structure in solution. Compared to NMR, MS provides information of lower resolution, but has fewer constraints concerning the size and the state of the protein. However, the resolution can be improved significantly if the protein is digested by several different proteases.<sup>34</sup> Another alternative is the use of directed mutagenesis, which can reach a single residue resolution as well as the above-mentioned techniques.<sup>35</sup> We present here characterization of aMb bound to anionic LUVs. The H/D exchange experiments have been coupled with MS, and we have been able to characterize the interacting regions of the protein at pH 5.5 and pH 4; i.e. for the two states of aMb bound to LUVs that we described earlier.<sup>24</sup>

## Results

### Peptide mapping

In a first step, we digested aMb using pepsin and performed liquid chromatography tandem MS (LC-MS/MS) analysis. On the basis of the tandem mass spectra, we were able to identify 20 peptides covering the whole protein sequence (Figure 1). However, many of the peptides were too long to provide reasonable information about H/D exchange (Figure 1). In order to increase the resolution of our



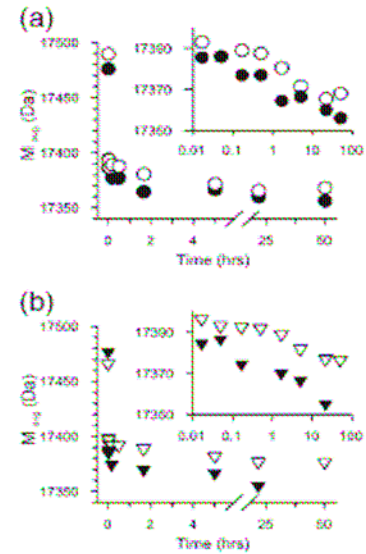
**Figure 1.** Peptide map of aMb. Peptides obtained by protease type XIII or pepsin digestion of aMb are shown as black or grey left to right arrows, respectively. Helices A-H, as found in the aMb structure (Protein Data Bank ID 1UFP), are shown as boxes with the respective letter above the sequence. Unstructured regions are displayed as straight lines.

experiments, we digested the protein using protease type XIII. We again reached 100% sequence coverage but with 27 peptides. When the peptides resulting from both digestions were combined into a peptide map, several overlapping peptides were obtained (Figure 1), importantly in the interacting regions of the protein, as will be shown later.

#### Global kinetics of exchange

The samples were prepared as described in Materials and Methods. In brief, the fully deuterated aMb in a citrate buffer of pD 4.0 or 5.5 was mixed with freshly prepared  $^{-}$ LUVs and the pD was adjusted to the desired value. The final concentration of aMb was 26  $\mu$ M and the lipid to protein molar ratio was 300. The mixture was incubated for 2 h at room temperature. Then, the samples were quickly diluted tenfold into hydrogenated citrate buffer and the kinetic study was started. In this setup, used less frequently,<sup>36</sup> the protein is deuterated in the initial state of the exchange reaction and deuterons are exchanged for protons. Aliquots were taken at different times, ranging from minutes to hours. For comparison, the aMb in solution was subjected to back-exchange at both pH values. The exchange was quenched (pH lowered to 2.2) by addition of phosphoric acid, the samples frozen in liquid nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Before analysis, the aliquots were thawed and 0.5  $\mu$ l was spotted on the matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) target, where it was mixed with the MALDI matrix (sinapinic acid), and dried quickly (20–30 s) under a stream of nitrogen. This procedure was repeated for each aliquot. MALDI spectra were acquired in a linear mode and three measurements with external calibration were performed. The measured masses from all three measurements were averaged. Although the MALDI matrix was prepared in hydrogenated solvents, the initial samples (time 0 in Figure 2, main frame) were analyzed as fully deuterated on all 149 exchangeable back-bone amides. Depending on the conditions, this initial value was between 17470 Da and 17490 Da. This is in agreement with the expected mass of aMb, fully deuterated at the peptide bonds. Because the exchange at the side-chains is fast, it was probably completed before the sample was dried.

The period of exchange varied between 1 min and 50 h (Figure 2). After one minute of exchange the mass of the protein was between 17385 Da and 17395 Da, depending on the experiments. Therefore, we had access to approximately 40% of the exchange and we could record only the slowest exchangeable amides. At both pH values, the mass obtained after



**Figure 2.** Kinetics of global H/D exchange monitored by MALDI-MS. (a) Exchange performed at pH 5.5. (b) Exchange performed at pH 4.0. The insets show the kinetics with the time plotted on a logarithmic scale. Symbols in the graphs: (▽) aMb in the presence of  $^{-}$ LUVs at pH 4; (▼) aMb in solution at pH 4; (○) aMb in the presence of  $^{-}$ LUVs at pH 5.5; (●) aMb in solution at pH 5.5.

1 min of exchange was slightly higher for the kinetics in the presence of  $^{-}$ LUVs (Figure 2(a) and (b); insets, time plotted on a logarithmic scale). This was the first indication that interaction of the protein with the vesicles decelerates H/D exchange. At pH 5.5, the H/D exchange kinetics that could be recorded was slower in the presence of  $^{-}$ LUVs; this is particularly obvious in the inset in Figure 2(a). Moreover, it seems that a few amides remain protected against the exchange after 50 h. The effect of the interaction with the membrane is more pronounced at pH 4 (Figure 2(b)). The exchange kinetics recordable with our protocol is much slower in the presence of vesicles (Figure 2(b); inset) and an excess of around 25 Da is detected after 50 h of exchange. This suggests that a significant number of amides are protected against the exchange due to the interaction with the membrane.

#### Local kinetics

In order to monitor local kinetics of individual parts of aMb, we digested the protein in aliquots

**Figure 3.** Kinetics of back-exchange for selected peptides generated from aMb by proteolysis with pepsin or protease type XIII. Peptides from both regions involved in the interaction with  $^{-}$ LUVs are shown. (a) Peptides covering the helix A; (b) peptides covering the helix C. Kinetics is shown for times between 3 and 34 h of back-exchange. The  $y$ -axis represents the average molecular mass of the peptide and starts at a fully hydrogenated average mass. The numbers for the first and last amino acids of the peptide are shown in the top right corner of each graph. Symbols are as defined in the legend to Figure 2. The errors were estimated on the basis of two independent preparations and mass spectrometric analyses. They are either within the size of the symbols or indicated as error bars.



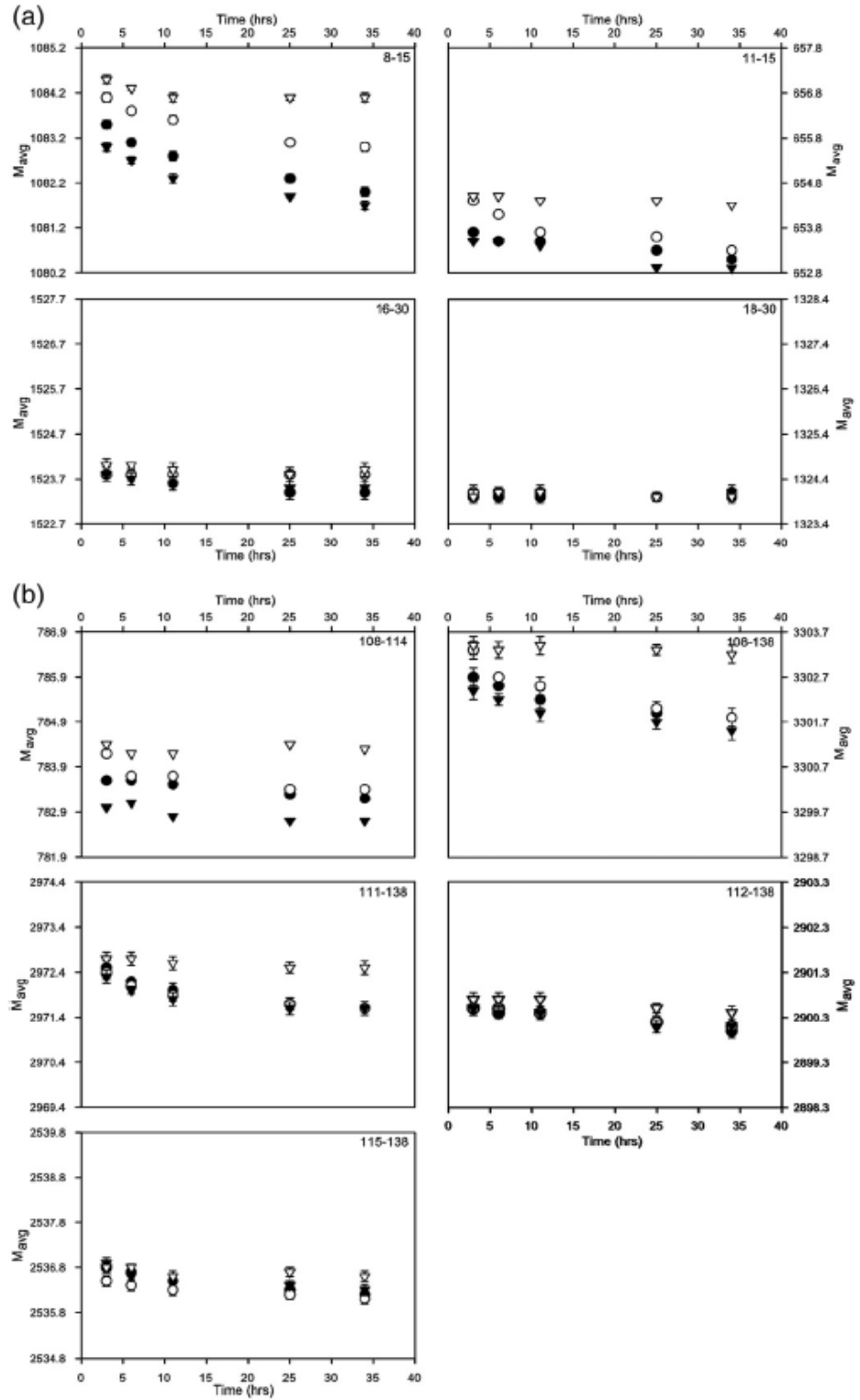


Figure 3 (legend on previous page)

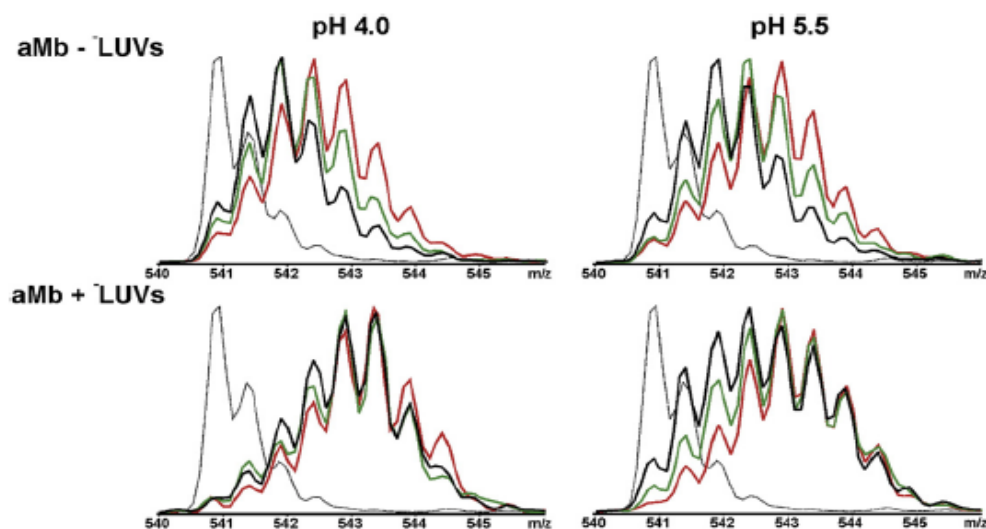
collected after 3 h, 6 h, 11 h, 25 h, and 34 h of H/D exchange. The digestion performed either by pepsin or protease type XIII resulted in 20 or 27 peptides, respectively. To reveal the differences in deuteration due to the interaction of aMb with  $\bar{\text{LUVs}}$  at both pH values, we overlaid the averaged isotopic profiles of the individual peptides. This allowed us to make a rough estimation of whether there is any influence of the vesicles on the exchange rate, especially in the case of singly and doubly charged ions. For highly charged ions (3+ and more), that were not isotopically resolved, the differences were not so obvious using this approach. To improve the comparison, we performed averaging of the data, smoothing and ion-related deconvolution. The average masses were plotted as a function of time (Figure 3).

From the kinetics it was evident that regions 1–7, 18–107 and 139–154 are not involved directly in the interactions, since there was no difference between the aMb with and without  $\bar{\text{LUVs}}$  for any of the peptides covering these regions (e.g. Figure 3(a) peptide 18–30). On the other hand, marked differences were found between the two pH values in the region 8–15 covered by peptides 1–12, 8–10, 8–15 and 11–15 (Figure 3). The changes in the isotopic profiles are shown for peptide 8–15 in Figure 4. The isotopic profiles obtained for various times of exchange are compared for each condition. The isotopic profile of the protein shifts toward a lower mass as a consequence of H/D exchange. In the absence of  $\bar{\text{LUVs}}$  (top views), the shift of the isotopic profiles due to the exchange is obvious for both pH values. At pH 4 in the presence of  $\bar{\text{LUVs}}$  (bottom left view), very little shift is detected because only the highly protected amides are still deuterated at that stage of the kinetics (3–34 h). At pH 5.5 in the presence of  $\bar{\text{LUVs}}$  (bottom right view), the decrease in the

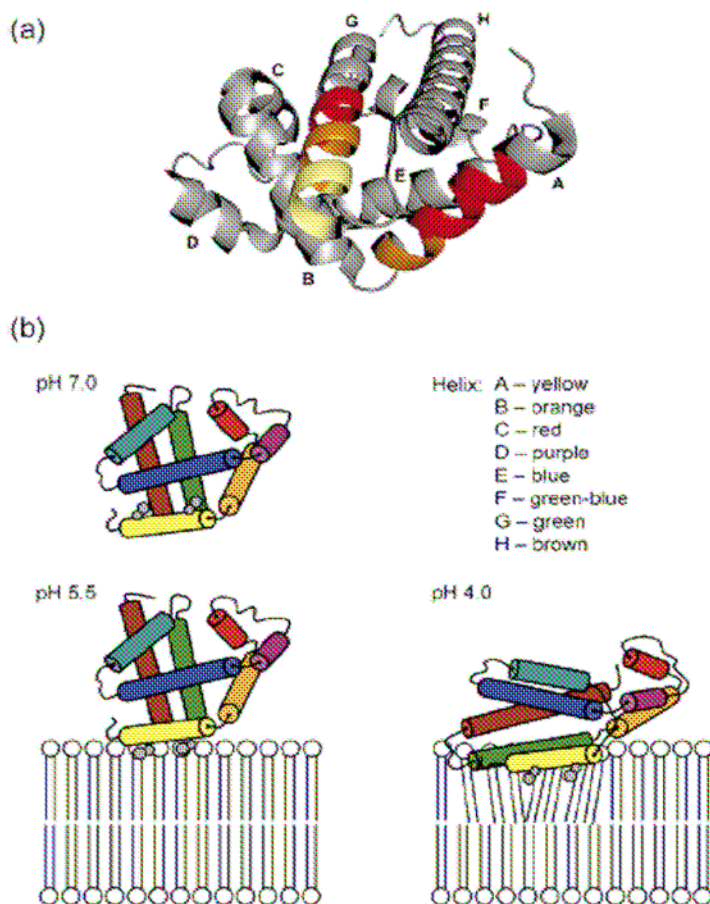
average mass is the consequence of the broadening of the isotopic profile rather than a real shift. On that basis, we can draw a conclusion that the region 8–15 represents a site of interaction between aMb and  $\bar{\text{LUVs}}$ .

The results for peptide 11–15 (Figure 3) are in agreement with those described for peptide 8–15 and confirm that this region of the protein is involved in interaction with the membrane at both pH values. We notice that for both peptides, the influence of the interactions with the membrane on the kinetics of H/D exchange is more pronounced at pH 4. A small effect due to the presence of  $\bar{\text{LUVs}}$  is still detected for peptide 16–30, while no protection is observed in the case of peptide 18–30. Therefore, the region of interaction in the N-terminal part of aMb presumably can be extended to residues 16 and 17. Altogether, these results indicate that the  $\alpha$ -helix A is involved in the interaction of aMb with  $\bar{\text{LUVs}}$  at pH 5.5 and pH 4. This is illustrated in Figure 5(a), which summarizes the results of the local kinetics at pH 4.

Another region of the interaction was localized closer to the C terminus; namely, in helix G between amino acid residues 108–111. Peptides 108–114, 108–138 and 111–138 were much more protected against exchange at pH 4 in the presence of  $\bar{\text{LUVs}}$  (Figure 3(b)). The protective effect was still detected for peptides 112–138 and 115–138, but it was much smaller. Thus, region 108–111 can be considered as strongly protected and region 112–115 as weakly protected (shown in Figure 5(a) in red and orange, respectively). Unlike in the N-terminal region, we cannot determine the limit for the weak interaction accurately (residues 112–115). However, based on fragment 120–138, we know that it does not reach further than the amino acid bond between residues 119 and 120 (shown in Figure 5(a) in yellow). The



**Figure 4.** Changes of the isotopic envelope of peptide 8–15 as a function of time of back-exchange: 3 h (red), 11 h (green), 34 h (black), at pH 4 (left panels) and pH 5.5 (right panels), and either in the presence (lower half) or in the absence (upper half) of  $\bar{\text{LUVs}}$ . The isotopic profile of fully hydrogenated peptide is shown as a grey line.



**Figure 5.** (a) Three-dimensional model of aMb (1UFP) with highlighted regions through which aMb interacts with  $\gamma$ LUVs at pH 4.0. Strongly protected regions (8–15 and 108–111) are shown in red and the orange highlights the neighboring parts that are weakly protected (16–17 and 112–115). The yellow indicates the region 116–119 for which we have no direct proof of whether it is protected/involved in the interaction. The capital letters indicate the individual helices A–H. (b) Scheme of the interaction between aMb and  $\gamma$ LUVs. At pH 7.0 the aMb is in the native form; at pH 5.5 it still retains the native-like conformation but interacts with the membrane via the helix A; at pH 4.0 the protein is in the molten globule state and interacts closely with the membrane via the helices A and G. The helices A–H are shown in different colors. The side-chains of the two Trp in helix A are shown in grey. The sizes of the protein and the membrane are proportional.

protection from exchange upon binding to vesicles at pH 5.5 is not so obvious for this region of the protein. The only influence is seen in the first time-point (3 h) for peptides 108–114 and 108–138, but is much smaller than that observed for peptide 8–15. Therefore, the interaction at pH 5.5 for this region of the protein can be considered much weaker than that of region 8–15.

## Discussion

Depending on the pH, two states of aMb interacting with  $\gamma$ LUVs can be distinguished.<sup>24</sup> At pH 5.5, the protein is bound to the lipid vesicles and, although heme binding is not possible, the protein has not undergone detectable conformational changes. At pH 4, the interactions between the protein and the lipid bilayer are tighter and the tryptophan residues are in a hydrophobic environment. At that stage, the interactions with aMb destabilize the lipid vesicles and lead to their fragmentation.<sup>23</sup> These two states of aMb interacting with  $\gamma$ LUVs have been characterized by H/D exchange experiments associated with MS. For comparison, aMb has been

characterized by the same methods in solution at the same pH values. Effects of the interactions with  $\gamma$ LUVs on the global kinetics of H/D exchange can be detected at both pH values (Figure 2). For both pH values, the parts of H/D exchange kinetics monitored with our protocols are slower in the presence of  $\gamma$ LUVs. At pH 5.5, the observed kinetics is decelerated less than ten times in the presence of lipid vesicles. At pH 4, the kinetics is about 100 times slower in the presence of lipid vesicles. This is in agreement with tighter interactions of aMb with  $\gamma$ LUVs at this pH.

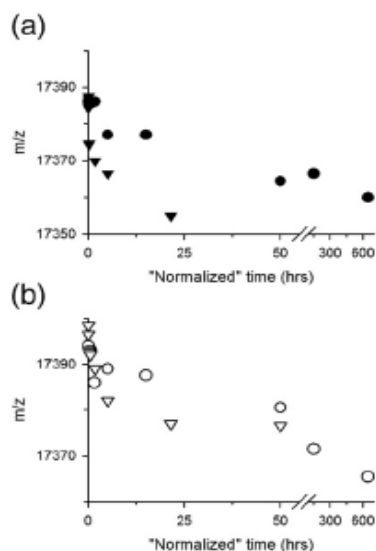
In our previous article, we could not conclude on the state of aMb bound to  $\gamma$ LUVs at pH 5.5. It could be either in a native-like state, as in solution at this pH, or in a partially folded state. The H/D exchange kinetics should enable us to distinguish between the two possibilities because of their high level of sensibility to the protein structure stability. One can note here that only the slowest steps of the exchange are monitored in our experiments. For instance, we could not detect the effect of the local pH within the interface on the exchange kinetics of weakly protected amides, as was the case in our previous study coupling H/D exchange and NMR.<sup>31</sup>

However, we can expect to be able to distinguish between a partially folded state and a native-like state, because the largest difference expected between the two cases is on the slowest steps of the exchange kinetics. For that purpose, the kinetics in solution must be compared, as well as those in the presence of lipid vesicles. In both cases, in solution and in the presence of LUVs, the two kinetics cannot be compared directly due to the effect of the pH on the intrinsic exchange rates, which is about 30 times faster at pH 5.5.<sup>37,38</sup> Therefore, for a given time of exchange, the effective time for the exchange is 31.4 fold larger at pH 5.5 than at pH 4. In order to take this effect into account, and to make comparisons, we have multiplied the experimental times of exchange of the kinetics recorded at pH 5.5 by 31.4 and created a normalized time-scale (Figure 6). In solution (Figure 6(a)), the corrected exchange kinetics is much slower at pH 5.5. This is due to the fact that aMb in solution is in the molten globule state at pH 4 and mostly in the native state at pH 5.5 with the amides being much more protected against the exchange by the tertiary structure. In the presence of LUVs (Figure 6(b)), the overall kinetics is still much slower at pH 5.5, while the interactions of aMb with the lipid bilayer is weaker than at pH 4, confirming that the protein remains in a mostly native-like structure upon binding to the membrane. Despite the fact that the kinetics is faster at pH 4, it seems to reach a plateau at a higher mass. This indicates that, although the protein is in the molten globule state at this pH, some of the residues become protected against the exchange even more than in the native state. The nature of this protection is due to

their interactions with the membrane. One should keep in mind that the interactions between the protein and the membrane are stronger at pH 4 and some parts of the proteins penetrate into the hydrophobic core of the lipid bilayer.

Coupling of electrospray MS with H/D exchange followed by proteolysis of the samples has allowed identification of the regions of interaction with membrane at pH 5.5 and at pH 4. The pH-dependence of the interaction of aMb with lipid bilayers is illustrated in Figure 5(b). At pH 5.5, only the  $\alpha$ -helix A has been clearly identified as interacting with the lipid bilayer and the structure of the protein remains mostly native-like. The  $\alpha$ -helix G, which is the most hydrophobic part of the protein, is buried within the hydrophobic core of the protein. As a consequence, it is not available for interacting with the lipid bilayer. Moreover, it is likely that at this pH the acidic side-chains are at least partially negatively charged and this induces electrostatic repulsion with the anionic membrane interface. For peptide 8-15 corresponding to  $\alpha$ -helix A, a broadening of the isotopic profile is observed at pH 5.5 in the presence of LUVs (Figure 4). This behavior suggests that instead of having one population acting rather homogeneously (as is the case at pH 4), we have several populations where the interaction is weakened to a different extent (presence of one, two or three negative charges on neighbor acidic side-chains for instance). As a result, we have a superposition of different kinetics that is, on the peptide level, observed as a broadening of the isotopic profile. Nevertheless,  $\alpha$ -helix A appears to be a preferred region for interactions with the lipid bilayer. At pH 4, the protein is in a partially folded state and the regions of interaction correspond to the amphiphilic  $\alpha$ -helices A and G (Figure 5). These helices are quite hydrophobic and contain basic amino acid side-chains able to interact with the acidic phospholipids. Acidic side-chains are also present within these helices. Their protonation at pH 4 cancels their electrostatic repulsion from the acidic phospholipids and makes tighter interactions of the protein with the membrane possible. These results are in agreement with penetration of the Trp residues (both of them in  $\alpha$ -helix A) into the hydrophobic core of the lipid bilayer, which we have reported.<sup>24</sup> As illustrated in Figure 5(b), we guess that helices A and G do not adopt a transmembrane conformation but rather remain lying between the hydrophobic core of the lipid bilayer and the interface. We do not have direct evidence for such conformation. However, aMb does not possess the properties of other globins, such as the translocation domain of diphtheria toxin and the pore-forming domain of colicins, to permeabilize the lipid vesicles without disrupting them,<sup>24</sup> and no part of its amino acid sequence shows a tendency to adopt a transmembrane conformation (data not shown).

The H/D exchange experiments coupled with MS have proven to be useful for identification of the regions of interactions with membranes of two different states of aMb. Our results highlight the importance of the amphiphilic  $\alpha$ -helices in the



**Figure 6.** Global H/D exchange kinetics (a) in solution and (b) in the presence of LUVs normalized (time for pH 5.5 multiplied by 31.4) for the difference in the intrinsic exchange rate at different pH values (4.0 versus 5.5). Symbols are as defined in the legend to Figure 2.

interactions between amphitropic proteins and the lipid bilayer. The use of MS has fewer constraints than NMR and can, undoubtedly, be applied to other amphitropic proteins of biological interest, such as the pore-forming domains of bacterial toxins or the proteins of the Bcl-2 family.

## Materials and Methods

Trifluoroacetic acid, pepsin and protease type XIII from *Aspergillus saitoi* were all obtained from Sigma-Aldrich. Acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) was obtained from SdS (Peypin, France).

### Recombinant protein preparation and deuteration

Sperm whale aMb was produced by heterologous expression in *Escherichia coli* and purified as described previously.<sup>39</sup> Freeze-dried hydrogenated aMb was dissolved at a concentration of 50 μM in pure <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (Euriso-top, Gif-sur-Yvette, France) at pD 7. After incubation overnight, the solution was freeze-dried and then dissolved in pure <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at pD 7. These steps were repeated three times.

### Preparation of large unilamellar vesicles

LUVs at a concentration of 20 mM were prepared by reversed phase evaporation in 4 mM sodium citrate/citric acid, 30 mM NaCl deuterated buffer at pD 7 (accurate pD was set using the equation  $pD_{corr} = pH_{read} + 0.4$ )<sup>40</sup> from egg phosphatidyl choline (EPC) and egg phosphatidic acid (EPA) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) at a molar ratio of 9:1.

### H/D exchange

The deuterated aMb at a final concentration of 26 μM was incubated with anionic LUVs at a 300:1 lipid/protein molar ratio for 2 h at room temperature. The pD was adjusted to pD 4 or pD 5.5 using NaO<sup>2</sup>H or <sup>2</sup>HCl. The control experiments, aMb in solution, were performed at the same time. The back-exchange was carried out in a cold room. It was initiated by tenfold dilution of deuterated samples into the hydrogenated buffer of corresponding pH (4 or 5.5). The H/D exchange was quenched by mixing 80 μl aliquots with 20 μl of 110 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C.

### Protein digestion

All protein digestions were performed in an ice-bath at 0 °C. Protease solutions (1.7 mg/ml of pepsin; 16 mg/ml of protease XIII), were prepared in 0.11 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 1.6) and cooled to 0 °C. Apomyoglobin was digested for 2 min at pH 2.2 with a protease/substrate ratio of 1/1 (w/w) for pepsin and 15/1 (w/w) for protease XIII.

### HPLC peptide separation

Peptides obtained by protein digestion were loaded onto a peptide MacroTrap (Michrom Bioresources, Auburn, CA) column and desalted by washing with HPLC solution A. Next, the peptides were eluted on a reversed phase C18 column (1 mm × 100 mm; Interchrom) separated by a linear

gradient from 15%–40% (v/v) solution B in 20 min followed by 40%–45% (v/v) solution B in 5 min at a flow rate of 50 μl/min. Before the separation, the column was equilibrated with 15% (v/v) B. Solution A was 0.03% (v/v) trifluoroacetic acid in water; solution B was 95% (v/v) CH<sub>3</sub>CN, 0.03% (v/v) trifluoroacetic acid. To minimize the loss of deuterium during separation, the valves, trap cartridge and column were cooled to 0 °C by immersion in an ice-bath.

### Mass spectrometric analyses

Global kinetics of H/D exchange were determined by MALDI-time-of-flight MS (Voyager Elite, Applied Biosystems). The samples were mixed on the target with sinapinic acid and dried quickly by a stream of nitrogen. Spectra were acquired in a linear mode over the mass range 8000–20,000 Da and processed using Data Explorer 4.0 (Applied Biosystems).

The MS/MS (mapping) and the kinetics of H/D exchange on peptide fragments were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire 3000+, Bruker Daltonics). The HPLC system was connected directly through a splitting T-piece to the electrospray ionization source of the spectrometer. The capillary voltage was set at 4 kV and an end-plate offset voltage at 500 V. The nebulizer gas (N<sub>2</sub>) pressure was set at 10 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa) and the dry gas (N<sub>2</sub>) flow at 8 l/min at a temperature of 250 °C. Mass spectra were acquired over the range of 350–1800 amu for MS and 150–2000 for MS/MS experiments. For the MS/MS experiments, the isolation width was 6 amu and the fragmentation amplitude was set to 1.5V. Data were processed using DataAnalysis 3.0.

## Acknowledgements

This work was supported by the Commissariat à l'Énergie Atomique (Programme: Signalisation et transport membranaire). We thank Professor Jean Smith for critical reading of the manuscript.

## References

1. Johnson, J. E. & Cornell, R. B. (1999). Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions. *Mol. Membr. Biol.* **16**, 217–235.
2. Holm, L. & Sander, C. (1993). Globin fold in a bacterial toxin. *Nature*, **361**, 309.
3. Parker, M. W. & Feil, S. C. (2005). Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **88**, 91–142.
4. Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J. & Eisenberg, D. (1992). The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature*, **357**, 216–222.
5. Bennett, M. J., Choe, S. & Eisenberg, D. (1994). Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Sci.* **3**, 1444–1463.
6. Parker, M. W., Pattus, F., Tucker, A. D. & Tsernoglou, D. (1989). Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature*, **337**, 93–96.
7. Fesik, S. W. (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell*, **103**, 273–282.

8. Tsujimoto, Y. (2002). Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *BioSci. Rep.* **22**, 47-58.
9. Thuduppathy, G. R., Craig, J. W., Kholodenko, V., Schon, A. & Hill, R. B. (2006). Evidence that membrane insertion of the cytosolic domain of Bcl-xL is governed by an electrostatic mechanism. *J. Mol. Biol.* **359**, 1045-1058.
10. Chenal, A., Savarin, P., Nizard, P., Guillaud, F., Gillet, D. & Forge, V. (2002). Membrane protein insertion regulated by bringing electrostatic and hydrophobic interactions into play. A case study with the translocation domain of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **277**, 43425-43432.
11. Petros, A. M., Olejniczak, E. T. & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1644**, 83-94.
12. van der Goot, F. G., Gonzalez-Manas, J. M., Lakey, J. H. & Pattus, F. (1991). A 'molten-globule' membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature*, **354**, 408-410.
13. Griko, Y. V., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y. & Kutysenko, V. P. (1988). Thermodynamic study of the apomyoglobin structure. *J. Mol. Biol.* **202**, 127-138.
14. Hughson, F. M., Wright, P. E. & Baldwin, R. L. (1990). Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. *Science*, **249**, 1544-1548.
15. Barrick, D. & Baldwin, R. L. (1993). Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding. *Biochemistry*, **32**, 3790-3796.
16. Kataoka, M., Nishii, I., Fujisawa, T., Ueki, T., Tokunaga, F. & Goto, Y. (1995). Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* **249**, 215-228.
17. Gulotta, M., Rogatsky, E., Callender, R. H. & Dyer, R. B. (2003). Primary folding dynamics of sperm whale apomyoglobin: core formation. *Biophys. J.* **84**, 1909-1918.
18. Jamin, M. (2005). The folding process of apomyoglobin. *Protein Pept. Letters*, **3**, 229-234.
19. Nishimura, C., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2006). Identification of native and non-native structure in kinetic folding intermediates of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.* **355**, 139-156.
20. Eliezer, D., Chung, J., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2000). Native and non-native secondary structure and dynamics in the pH 4 intermediate of apomyoglobin. *Biochemistry*, **39**, 2894-2901.
21. Bertagna, A. M. & Barrick, D. (2004). Nonspecific hydrophobic interactions stabilize an equilibrium intermediate of apomyoglobin at a key position within the electrodes AGH region. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 12514-12519.
22. Basova, L. V., Tiktopulo, E. I., Kashparov, I. A. & Bychkova, V. E. (2004). Conformational state of apomyoglobin in the presence of phospholipid vesicles at neutral pH. *Mol. Biol. (Mosk)*, **38**, 323-332.
23. Lee, J. W. & Kim, H. (1992). Fragmentation of dimyristoylphosphatidylcholine vesicles by apomyoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 354-361.
24. Vernier, G., Chenal, A., Vitrac, H., Barumandzadhe, R., Montagner, C. & Forge, V. (2007). Interactions of apomyoglobin with membranes: mechanisms and effects on the heme uptake. *Protein Sci.* In the press.
25. Redfield, C. (2004). Using nuclear magnetic resonance spectroscopy to study molten globule states of proteins. *Methods*, **34**, 121-132.
26. Eyles, S. J. & Kaltashov, I. A. (2004). Methods to study protein dynamics and folding by mass spectrometry. *Methods*, **34**, 88-99.
27. Krishna, M. M., Hoang, L., Lin, Y. & Englander, S. W. (2004). Hydrogen exchange methods to study protein folding. *Methods*, **34**, 51-64.
28. Miranker, A., Robinson, C. V., Radford, S. E. & Dobson, C. M. (1996). Investigation of protein folding by mass spectrometry. *FASEB J.* **10**, 93-101.
29. Dyson, H. J. & Wright, P. E. (1998). Equilibrium NMR studies of unfolded and partially folded proteins. *Nature Struct. Biol.* **5**, 499-503.
30. Konermann, L. & Simmons, D. A. (2003). Protein-folding kinetics and mechanisms studied by pulse-labeling and mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 1-26.
31. Chenal, A., Vernier, G., Savarin, P., Bushmarina, N. A., Geze, A., Guillaud, F. et al. (2005). Conformational states and thermodynamics of alpha-lactalbumin bound to membranes: a case study of the effects of pH, calcium, lipid membrane curvature and charge. *J. Mol. Biol.* **349**, 890-905.
32. Pinheiro, T. J., Cheng, H., Seeholzer, S. H. & Roder, H. (2000). Direct evidence for the cooperative unfolding of cytochrome c in lipid membranes from H-(2)H exchange kinetics. *J. Mol. Biol.* **303**, 617-626.
33. Halskau, O., Proystein, N. A., Muga, A. & Martinez, A. (2002). The membrane-bound conformation of alpha-lactalbumin studied by NMR-monitored 1H exchange. *J. Mol. Biol.* **321**, 99-110.
34. Cravello, L., Lascoux, D. & Forest, E. (2003). Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2387-2393.
35. Brier, S., Lemaire, D., DeBonis, S., Kozielski, F. & Forest, E. (2006). Use of hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and mutagenesis as a tool to identify the binding region of inhibitors targeting the human mitotic kinesin Eg5. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 456-462.
36. Mandell, J. G., Falick, A. M. & Komives, E. A. (1998). Identification of protein-protein interfaces by decreased amide proton solvent accessibility. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 14705-14710.
37. Wang, L., Lane, L. C. & Smith, D. L. (2001). Detecting structural changes in viral capsids by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Protein Sci.* **10**, 1234-1243.
38. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. & Englander, S. W. (1993). Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **17**, 75-86.
39. Weisbuch, S., Gerard, F., Pasdeloup, M., Cappadoro, J., Dupont, Y. & Jamin, M. (2005). Cooperative sub-millisecond folding kinetics of apomyoglobin pH 4 intermediate. *Biochemistry*, **18**, 7013-7023.
40. Glasoe, P. K. & Long, F. A. (1960). Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Phys. Chem.* **64**, 188-189.

Edited by K. Kuwajima

(Received 18 October 2006; received in revised form 24 January 2007; accepted 6 February 2007)  
Available online 13 February 2007



# *BIBLIOGRAPHIE*





- Ahmed, S. N., Brown, D. A., and 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
- Anderson, R. G., & Jacobson, K. (2002)** A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296, 1821-1825.
- Antonny, B., Gounon, P., Schekman, R., Orci, L. (2003)**. Self-assembly of minimal COPII cages. *EMBO Rep.* 4, 419-424.
- Bade, S., Rummel, A., Reisinger, C., Karnath, T., Ahnert-Hilger, G., Bigalke, H.,**
- Binz, T. (2004)** Botulinum neurotoxin type D enables cytosolic delivery of enzymatically active cargo proteins to neurones via unfolded translocation intermediates. *J Neurochem.*, 91 1461-1472.
- Bai, J., & Pagano, R. E. (1997)** Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry* 36, 8840-8848
- Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., Englander, S. W. (1993)**. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* 17, 75-86.
- Barrick, D., & Baldwin, R. L. (1993)**. Three-state analysis of sperm whale apomyoglobin folding. *Biochemistry* 32, 3790-3796.
- Bennett, M. J., Choe, S., & Eisenberg, D. (1994)**. Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Prot. Sci.* 3, 1444-1463.
- Bigay, J., Gounon, P., Robineau, S., and Antonny, B. (2003)** Lipid packing sensed by ArfGAP1 couples COPI coat disassembly to membrane bilayer curvature. *Nature* 426, 563-566.
- Bigay J, Casella JF, Drin G, Mesmin B, Antonny B. (2005)** ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *EMBO J* 13, 2244-2253.
- Bradley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R. J., Young, J. A. (2001)** Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 6860, 225-229.
- Bretscher, M. S. (1996)** Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells. *Cell* 87, 601-606
- Breyton, C., Chabaud, E., Chaudier, Y., Pucci, B., Popot, J. L. (2004)** Hemifluorinated surfactants: a non-dissociating environment for handling membrane proteins in aqueous solutions? *FEBS Lett.* 564, 312-8

**Brunger, A. T., Breidenbach, M. A., Jin, R., Fischer, A., Santos, J. S., Montal, M. (2007)** Botulinum neurotoxin heavy chain belt as an intramolecular chaperone for the light chain.

*PLoS Pathog.* 3, 1191-1194.

**Burn, P. (1988)** Amphitropic proteins: a new class of membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 13, 79-83.

**Burns-Hamuro, L. L., Hamuro, Y., Kim, J. S., Sigala, P., Fayos, R., Stranz, D. D., Jennings, P.A., Taylor, S. S., and Woods, V. L., Jr. (2005)** Distinct interaction modes of an AKAP bound to two regulatory subunit isoforms of protein kinase A revealed by amide hydrogen/deuterium exchange. *Protein Sci.* 12, 2982-2992.

**Buss, F., Luzio, J. P. & Kendrick-Jones, J. (2002)** Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic* 3, 851-858

**Bychkova, V. E., Dujsekina, A. E., Klenin, S. I., Tiktopulo, E. I., Uversky, V. N., and Ptitsyn, O.B. (1996)** Molten globule-like state of cytochrome c under conditions simulating those near the membrane surface. *Biochemistry* 35, 6058-6063.

**Casal, E., Federici, L., Zhang, W., Fernandez-Recio, J., Priego, E. M., Miguel, R. N., DuHadaway, J. B., Prendergast, G. C., Luisi, B. F., Laue, E. D. (2006)** The crystal structure of the BAR domain from human Bin1/amphiphysin II and its implications for molecular recognition. *Biochemistry* 43, 12917-12928.

**Chai, Q., Arndt, J. W. Dong, M., Tepp, W. H., Johnson, E. A., Chapman, E. R., Stevens, R. C. (2006)** Structural basis of cell surface receptor recognition by botulinum neurotoxin B.

*Nature.* 444, 1096-10100.

**Chen, F., Kuziemko, G. M., Stevens, R. C. (1998)**

Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxic component, and the 900-kilodalton botulinum toxin complex species. *Infect Immun.* 66, 2420-2425.

**Chenal, A., Savarin, P., Nizard, P., Guillain, F., Gillet, D., and Forge, V. (2002)** Membrane protein insertion regulated by bringing electrostatic and hydrophobic interactions into play. A case study with the translocation domain of diphtheria toxin. *J Biol Chem* 277, 43425-43432.

**Chenal, A., Vernier, G., Savarin, P., Bushmarina, N. A., Geze, A., Guillain, F., Gillet, D. & Forge, V. (2005).** Conformational states and thermodynamics of alpha-lactalbumin bound to membranes: a case study of the effects of pH, calcium, lipid membrane curvature and charge. *J. Mol. Biol.* 349, 890-905.

**Choe, S., Bennett, M. J., Fujii, G., Curmi, P. M., Kantardjieff, K. A., Collier, R. J., & Eisenberg, D. (1992).** The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature.* 357, 216-222.

**Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003)** Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.

- Couesnon, A., Pereira, Y., Popoff, M. R. (2007)** Receptor-mediated transcytosis of botulinum neurotoxin A through intestinal cell monolayers. *Cell Microbiol.* Sous presse.
- Cravello, L., Lascoux, D., and Forest, E. (2003)** Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 2387-2393.
- Cullis, P. R., & de Kruijff, B. (1979)** Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 559, 399-420.
- de Kruijff, B. (1997)** Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr Opin Chem Biol* 1, 564-569.
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R., Chapman, E. R. (2006)** SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science.* 312, 592-596.
- Dong, M., Richards, D. A., Goodnough, M. C., Tepp, W. H., Johnson, E.A., Chapman, E. R. (2003)** Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol.* 162, 1293-12303
- Eliezer, D., Chung, J., Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2000).** Native and non-native secondary structure and dynamics in the pH 4 intermediate of apomyoglobin. *Biochemistry* 39, 2894-2901.
- Engen, J. R., & Smith, D. L. (2000)** Investigating the higher order structure of proteins. Hydrogen exchange, proteolytic fragmentation, and mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 146, 95-112.
- Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R., Yahi, N. (2002)** Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev Mol Med.*4, 1-22.
- Farsad, K., Ringstad, N., Takei, K., Floyd, S. R., Rose, K., De Camilli, P. (2001)** Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J. Cell Biol.* 155, 193–200.
- Fattal, D. R., & Ben-Shaul, A. (1993)** A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch. *Biophys J* 65, 1795-809.
- Fesik, S.W. (2000).** Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103, 273-282.
- Fischer, A., & Montal, M. (2007a)** Single molecule detection of intermediates during botulinum neurotoxin translocation across membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 10447-10452
- Fischer, A., & Montal, M. (2007b)** Crucial Role of the Disulfide Bridge between Botulinum Neurotoxin Light and Heavy Chains in Protease Translocation across Membranes. *J Biol Chem.* 282, 29604-29611

**Fischer, T., Lu, L., Haigler, H. T., Langen, R. (2007)** Annexin B12 is a sensor of membrane curvature and undergoes major curvature-dependent structural changes. *J Biol Chem.* *13*, 9996-10004.

**Fujinaga, Y. (2006)** Transport of bacterial toxins into target cells: pathways followed by cholera toxin and botulinum progenitor toxin. *J Biochem (Tokyo).* *140*, 155-160.

**Fujinaga, Y., Inoue, K., Watarai, S., Sakaguchi, Y., Arimitsu, H., Lee, J. C., Jin, Y., Matsumura, T., Kabumoto, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Nishikawa, A., Oguma, K. (2004)** Molecular characterization of binding subcomponents of Clostridium botulinum type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiology.* *150*, 1529-1538.

**Fujinaga, Y., Inoue, K., Watanabe, S., Yokota, K., Hirai, Y., Nagamachi, E., Oguma, K. (1997)** The haemagglutinin of Clostridium botulinum type C progenitor toxin plays an essential role in binding of toxin to the epithelial cells of guinea pig small intestine, leading to the efficient absorption of the toxin. *Microbiology.* *143*, 3841-3847.

**Garcia-Saez, A. J., Mingarro, I., Perez-Paya, E., and Salgado, J. (2004)** Membrane-insertion fragments of Bcl-xL, Bax, and Bid. *Biochemistry* *43*, 10930-10943.

**Glasoe, P. K., and Long, F. A. (1960)** Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Phys. Chem* *64*, 188-190.

**Griko, Y. V., Privalov, P. L., Venyaminov, S. Y., & Kutysenko, V. P. (1988).** Thermodynamic study of the apomyoglobin structure. *J. Mol. Biol.* *202*, 127-138.

**Gulotta, M., Rogatsky, E., Callender, R. H., & Dyer, R. B. (2003).** Primary folding dynamics of sperm whale apomyoglobin: core formation. *Biophys. J.* *84*, 1909-1918.

**Haeghebaert, S., Popoff, M.R., Carlier, J.P., Pavillon, G., and Delarocque-Astagneau, E. (2002).** Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en France, 1991-2000. *Bul Epidémiol. Hebdo.* *14*, 57-59.

**Halskau, O., Froystein, N.A., Muga, A. & Martinez, A. (2002).** The membrane-bound conformation of  $\alpha$ -lactalbumin studied by NMR-monitored <sup>1</sup>H exchange. *J. Mol. Biol.* *321*, 99-110.

**Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Sudhof, T. C., Niemann, H. (1994)** Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* *13*, 5051-5061.

**Helenius, A., and Aebi, M. (2001)** Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* *291*, 2364-2369.

**Heymann, J. B., Zakharov, S. D., Zhang, Y. L., and Cramer, W. A. (1996)** Characterization of electrostatic and nonelectrostatic components of protein--membrane binding interactions. *Biochemistry* *35*, 2717-2725.

**Hinshaw, J. E. & Schmid, S. L. (1995)** Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374, 190–192.

**Hoch, D. H., Romero-Mira, M., Ehrlich, B.E., Finkelstein, A., DasGupta, B. R., Simpson, L. L. (1985)** Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 1692-1696.

**Hong, W. (2005)** SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta* 1744, 493-517.

**Holm, L., and Sander, C. (1993a).** Globin fold in a bacterial toxin. *Nature* 361, 309.

**Holm, L., and Sander, C. (1993b).** Structural alignment of globins, phycocyanins and colicin A. *FEBS Lett.* 315, 301-306.

**Hughson, F. M., Wright, P. E., & Baldwin, R. L. (1990).** Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. *Science* 249, 1544-1548.

**Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N. J., Poulain, B. (2000)** How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie.* 82, 427-446.

**Hvidt, A., and Nielsen, S. O. (1966)** Hydrogen exchange in proteins. *Adv Protein Chem* 21, 287-386.

**Jacobs, R. E., and White, S. H. (1987)** Lipid bilayer perturbations induced by simple hydrophobic peptides. *Biochemistry* 26, 6127-6134.

**Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T. C. (2003)** *Membrane fusion.* *Cell* 112, 519-533.

**Jamin, M. (2005).** The folding process of apomyoglobin. *Protein Pept. Lett.* 3, 229-234.

**Janiak, M. J., Small, D. M., and Shipley, G. G. (1979)** Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. *J Biol Chem* 254, 6068-6078.

**Jin, R., Rummel, A., Binz, T., Brunger, A. T. (2006)** Botulinum neurotoxin B recognizes its protein receptor with high affinity and specificity. *Nature.* 444 1092-1095.

**Johnson, J. E., and Cornell, R. B. (1999)** Amphitropic proteins: regulation by reversible membrane interactions (review). *Mol Membr Biol* 16, 217-235.

**Kataoka, M., Nishii, I., Fujisawa, T., Ueki, T., Tokunaga, F., & Goto, Y. (1995).** Structural characterization of the molten globule and native states of apomyoglobin by solution X-ray scattering. *J. Mol. Biol.* 249, 215-228.

**Kay, M. S., and Baldwin, R.L. (1998).** Alternative models for describing the acid unfolding of the apomyoglobin folding intermediate. *Biochemistry* 37, 7859-7868.

**Krantz, B. A., Finkelstein, A., Collier, R. J. (2006)** Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. *J Mol Biol.* 355, 968-979.

- Koriazova L. K., and Montal M. (2003)** Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nat Struct Biol.* 10, 13-18.
- Kukreja, R., & Singh, B. R.(2005)** Biologically active novel conformational state of botulinum, the most poisonous poison. : *J Biol Chem.* 280, 39346-39352.
- Kurazono, H., Mochida, S., Binz, T., Eisel, U., Quanz, M., Grebenstein, O., Wernars, K., Poulain, B., Tauc, L., Niemann, H. (1992)** Minimal essential domains specifying toxicity of the light chains of tetanus toxin and botulinum neurotoxin type A. *J Biol Chem.* 267, 14721-14729.
- Lacy, D. B., & Stevens, R.C. (1999)** Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol.* 291, 1091-1104.
- Lacy, D. B., Tepp, W., Cohen, A. C., DasGupta, B. R., Stevens, R. C. (1998a)** Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol.* 5, 898-902.
- Lacy, D. B., & Stevens, R. C. (1998b)** Unraveling the structures and modes of action of bacterial toxins. *Curr Opin Struct Biol.* 8, 778-784.
- Lacy, D. B., & Stevens, R.C. (1997)** Recombinant expression and purification of the botulinum neurotoxin type A translocation domain. *Protein Expr Purif.* 11, 195-200.
- Ladokhin, A. S., Isas, J. M., Haigler, H. T., and White, S. H. (2002)** Determining the membrane topology of proteins: insertion pathway of a transmembrane helix of annexin 12. *Biochemistry* 41, 13617-13626.
- Lalli, G., Bohnert, S., Deinhardt, K., Verastegui, C., Schiavo, G. (2003)** The journey of tetanus and botulinum neurotoxins in neurons. *Trends Microbiol.* 11, 431-437.
- Lebeda, F. J., & Olson, M. A. Structural predictions of the channel-forming region of botulinum neurotoxin heavy chain. *Toxicon.* 33, 559-567.**
- Lee, A. G. (2004)** How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1666, 62-87.
- Lee, A. G. (2003)** Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta* 1612, 1-40.
- Lee, J. W., and Kim, H. (1992).** Fragmentation of dimyristoylphosphatidylcholine vesicles by apomyoglobin. *Arch Biochem Biophys.* 297, 354-361.
- Lenaz, G. (1987)** Lipid fluidity and membrane protein dynamics. *Biosci Rep* 7, 823-837.
- London, E. (1992)** How bacterial protein toxins enter cells; the role of partial unfolding in membrane translocation. *Mol Microbiol.* 6, 3277-3282.

- Louie, G. V., Yang, W., Bowman, M. E., Choe, S. (1997)** Crystal structure of the complex of diphtheria toxin with an extracellular fragment of its receptor. *Mol Cell* 1, 67-78.
- Lucero, H. A., and Robbins, P. W. (2004)** Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys* 426, 208-224.
- McMahon, H. T., & Gallop, J. L. (2005)** Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. 438 590-6.
- Maeda, Y., Watanabe, R., Harris, C. L., Hong, Y., Ohishi, K., Kinoshita, K., and Kinoshita, T. (2001)** PIG-M transfers the first mannose to glycosylphosphatidylinositol on the luminal side of the ER. *Embo J* 20, 250-261.
- Man P, Montagner C, Vernier G, Dublet B, Chenal A, Forest E, Forge V. (2007)** Defining the interacting regions between apomyoglobin and lipid membrane by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry. *J Mol Biol.* 2, 464-472.
- Mandell, J. G., Falick, A. M., Komives, E.A. (1998)** Identification of protein-protein interfaces by decreased amide proton solvent accessibility. *Proc Natl Acad Sci* 9,5 14705-14710.
- Maksymowych, A. B., & Simpson, L. L. (2004)** Structural features of the botulinum neurotoxin molecule that govern binding and transcytosis across polarized human intestinal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 310, 633-641.
- Maksymowych, A. B., Reinhard, M., Malizio, C. J., Goodnough, M. C., Johnson, E. A., Simpson LL. (1999)** Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infect Immun.* 67, 4708-4712.
- Maksymowych, A. B., & Simpson, L. L. (1998)** Binding and transcytosis of botulinum neurotoxin by polarized human colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 273 21950-7.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., Binz, T. (2006)** The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett.* 580, 2011-2014.
- Marks, B., Stowell, M. H., Vallis, Y., Mills, I. G., Gibson, A., Hopkins, C. R., McMahon, H. T. (2001).** GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature* 410, 231-235
- Melnyk, R. A., Collier, R. J. (2006)** A loop network within the anthrax toxin pore positions the phenylalanine clamp in an active conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26, 9802-9807.
- Méré, J., Morlon-Guyot, J., Bonhoure, A., Chiche, L., Beaumelle, B. (2005)** Acid-triggered membrane insertion of Pseudomonas exotoxin A involves an original mechanism based on pH-regulated tryptophan exposure. *J Biol Chem.* 280, 21194-211201.



- Ménétreay, J., Gillet, D., Ménez, A. (2005)** A Structural features common to intracellularly acting toxins from bacteria. *Toxicon*. 45, 129-137.
- Montagner, C., Perier, A., Pichard, S., Vernier, G., Menez, A., Gillet, D., Forge, V., Chenal, A. (2007)** Behavior of the N-Terminal Helices of the Diphtheria Toxin T Domain during the Successive Steps of Membrane Interaction. *Biochemistry*. 7, 1878-1887.
- Montecucco, C., Rossetto, O., Schiavo, G. (2004)** Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol.*, 12442-12446.
- Montecucco, C., Papini, E., Schiavo, G. (1994)** Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett*. 346, 92-98.
- Newmeyer, D. D., & Ferguson-Miller, S. (2003)** Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112, 481-490.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Takahashi, M., Kozaki, S. (1996)** The high-affinity binding of Clostridium botulinum type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett*. 378, 253-257.
- Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A., Ito, T., Takahashi, M., Kozaki, S. (1994)** Identification of protein receptor for Clostridium botulinum type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem*. 269, 10498-10503.
- Nossal, R. (2001).** Energetics of clathrin basket assembly. *Traffic* 2, 138–147.
- Oblatt-Montal, M., Yamazaki, M., Nelson, R., Montal, M. (1995)** Formation of ion channels in lipid bilayers by a peptide with the predicted transmembrane sequence of botulinum neurotoxin A. *Protein Sci*. 4, 1490-1497.
- Palchevskyy, S. S., Posokhov, Y. O., Olivier, B., Popot, J. L., Pucci, B., Ladokhin, A. S. (2006)** Chaperoning of insertion of membrane proteins into lipid bilayers by hemifluorinated surfactants: application to diphtheria toxin. *Biochemistry* 45, 2629-2635.
- Parker, M. W., & Feil, S. C. (2005)** Poreforming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 88, 91-142.
- Parker, M. W., Pattus, F., Tucker, A. D., & Tsernoglou, D. (1989).** Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* 337, 93-96.
- Parikh S, & Singh BR. (2007)** Comparative membrane channel size and activity of botulinum neurotoxins A and E. *Protein J*. 26, 19-28.
- Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., McMahon, H. T.(2004)** BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495–499.

- Pinheiro, T. J., and Watts, A. (1994)** Lipid specificity in the interaction of cytochrome c with anionic phospholipid bilayers revealed by solid state <sup>31</sup>P NMR. *Biochemistry* 33, 2451-2458.
- Pinheiro, T. J., Cheng, H., Seeholzer, S. H., & Roder H. (2000).** Direct evidence for the cooperative unfolding of cytochrome c in lipid membranes from H-(2)H exchange kinetics. *J. Mol. Biol.* 303, 617-626.
- Prats, M., Tocanne, J. F., and Teissie, J. (1989)** Lateral proton conduction along a lipid-water interface layer: a molecular mechanism for the role of hydration water molecules. *Biochimie* 71, 33-36.
- Richnau, N., Fransson, A., Farsad, K. & Aspenstrom, P. (2004)** RICH-1 has a BIN/Amphiphysin/Rvsp domain responsible for binding to membrane lipids and tubulation of liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1034-1042.
- Rietveld, A. G., Killian, J. A., Dowhan, W., and de Kruijff, B. (1993)** Polymorphic regulation of membrane phospholipid composition in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268, 12427-12433.
- Rigaud, J. L., Bluzat, A., and Buschlen, S. (1983)** Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. *Biochem Biophys Res Commun* 111, 373-382.
- Rummel, A., Mahrhold, S., Bigalke, H., Binz, T. (2004)** The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol.* 51 631-643.
- Schiavo, G. (2006)** Structural biology: dangerous liaisons on neurons. *Nature* 7122, 1019-20.
- Schiavo, G., Matteoli, M., Montecucco, C. (2000)** Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev.* 80, 717-766.
- Schiavo, G., Rossetto, O., Santucci, A., DasGupta, B. R., Montecucco, C. (1992)** Botulinum neurotoxins are zinc proteins. *J Biol Chem.* 26,7 23479-23483.
- Schmid, M. F., Robinson, J. P., DasGupta, B.R. (1993)** Direct visualization of botulinum neurotoxin-induced channels in phospholipid vesicles. *Nature* 364, 827-830
- Scobie, H. M., Rainey, G. J., Bradley, K. A., Young, J.A. (2003)** Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9, 5170-5174
- Siegert, R., Leroux, M. R., Scheufler, C., Hartl, F. U., Moarefi, I. (2000)** Structure of the molecular chaperone prefoldin: unique interaction of multiple coiled coil tentacles with unfolded proteins. *Cell.* 103, 621-632.

- Silverman, J. A., Mindell, J. A., Zhan, H., Finkelstein, A., Collier, R. J. (1994)** Structure-function relationships in diphtheria toxin channels: I. Determining a minimal channel-forming domain. *J Membr Biol.* 137, 17-28.
- Simpson, L. L., Coffield, J. A., Bakry, N. (1994)** Inhibition of vacuolar adenosine triphosphatase antagonizes the effects of clostridial neurotoxins but not phospholipase A2 neurotoxins. *J Pharmacol Exp Ther.* 269, 256-262.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972)** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Sprong, H., van der Sluijs, P., and van Meer, G. (2001)** How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 504-513.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A. T. (1998)** Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* 395, 347-353.
- Suzuki, T., Watanabe, T., Mutoh, S., Hasegawa, K., Kouguchi, H., Sagane, Y., Fujinaga, Y., Oguma, K., Ohyama, T. (2005)** Characterization of the interaction between subunits of the botulinum toxin complex produced by serotype D through tryptic susceptibility of the isolated components and complex forms. *Microbiology.* 15,1 1475-1483.
- Turton, K., Chaddock, J. A., Acharya, K. R. (2002)** Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci.* 27, 552-558.
- Unwin, N. (2005).** Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J.Mol. Biol.* 346, 967-989
- van den Besselaar, A. M., de Druiff, B., van den Bosch, H., and van Deenen, L. L. (1978)** Phosphatidylcholine mobility in liver microsomal membranes. *Biochim Biophys Acta* 510, 242-255.
- van der Goot, F. G., Gonzalez-Manas, J. M., Lakey, J. H., & Pattus, F. (1991).** A 'molten-globule' membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* 354, 408-410.
- Vernier, G., Chenal, A., Vitrac, H., Barumandzadhe, R., Montagner, C., & Forge V. (2007).** Interactions of apomyoglobin with membranes: mechanisms and effects on the heme uptake. *Protein Sci.* 2, 391-400.
- Weisbuch, S., Gérard, F., Padeloup, M., Cappadoro, J., Dupont, Y., Jamin, M. (2005)** Cooperative sub-millisecond folding kinetics of apomyoglobin pH 4 intermediate. *Biochemistry* 18, 7013-7123.
- Wiederkehr, A., Staple, J., and Caroni, P. (1997)** The motility-associated proteins GAP-43, MARCKS, and CAP-23 share unique targeting and surface activity-inducing properties. *Exp Cell Res* 236, 103-116.

**Zachowski A. (1993)** Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J.* 294, 1-14.

**Zakharov, S. D., Lindeberg, M., Griko, Y., Salamon, Z., Tollin, G., Prendergast, F. G., and Cramer, W. A. (1998).** Membrane-bound state of the colicin E1 channel domain as an extended two-dimensional helical array. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4282-4287.

**Zhan, H., Choe, S., Huynh, P. D., Finkelstein, A., Eisenberg, D., and Collier, R. J. (1994).** Dynamic transitions of the transmembrane domain of diphtheria toxin: disulfide trapping and fluorescence proximity studies. *Biochemistry* 33, 11254-11263.

**Zhan, H., Oh, K. J., Shin, Y. K., Hubbell, W. L., and Collier, R. J. (1995).** Interaction of the isolated transmembrane domain of diphtheria toxin with membranes. *Biochemistry* 34, 4856-4863.

**Zimmerberg, J. (2000)** Are the curves in all the right places? *Traffic* 1, 366-368.

## Résumé

Les neurotoxines botuliques (BoNTs), toxines les plus efficaces connues, sont responsables du botulisme. Elles inhibent la libération d'acétylcholine aux jonctions neuromusculaires causant des paralysies flasques. Lors de l'intoxication, la BoNT se lie à ses récepteurs à la surface des neurones, puis est internalisée par endocytose. L'interaction de son domaine de translocation avec la membrane à l'intérieur de compartiments cellulaires acides permet le passage du domaine catalytique dans le cytosol. Le domaine de translocation de BoNT/A (Tm) a été exprimé à partir d'un gène de synthèse. L'insertion de Tm dans la membrane et son activité sont dépendantes du pH et apparaissent dès pH 5,5. Aucun changement de structure n'est détecté par spectroscopie. Cependant, la formation d'une structure quaternaire n'est pas exclue. L'activité de Tm est aussi sensible à la courbure de la membrane, ce qui pourrait permettre une régulation supplémentaire de sa fonction.

L'apomyoglobine appartient à la famille des protéines à repliement de type globine, comme certaines toxines bactériennes. Son interaction avec la membrane présente de fortes homologies avec celle du domaine de translocation de la toxine diphtérique. Ce processus à deux étapes (liaison puis insertion) est dépendant du pH et requiert le passage par un état partiellement replié. Pour chaque étape, les régions impliquées ont été localisées par des expériences d'échanges Hydrogène/Deuterium analysées par spectrométrie de masse. La liaison à la bicouche se fait par une hélice amphiphile, puis une hélice hydrophobe intervient pour l'insertion. Cette dernière n'est accessible qu'après formation de l'état partiellement replié.

**Mots-clés :** Toxine Botulique, Domaine de Translocation, Interactions protéine-membrane, apomyoglobine, Echanges Hydrogène/Deutérium, Spectrométrie de Masse.

## Summary

Botulinum neurotoxins (BoNTs), the most potent known toxins, are responsible for botulism. They inhibit acetylcholine release at the neuromuscular junction, inducing a flaccid paralysis. Upon intoxication, BoNT binds to its receptor at the plasma membrane of neurons and is then internalized by endocytosis. Inside acidic compartments, the interaction of its translocation domain with the membrane drives the translocation of the catalytic domain into the cytosol. The translocation domain of BoNT/A (Tm) was expressed and produced using a synthetic gene. Its insertion and activity have been shown to be pH dependent and to occur below pH 5.5. No structural change could be detected by spectroscopy. However, the formation of a quaternary structure is still possible. The sensitivity of Tm activity to membrane curvature has been observed. This could be an additional control to its function.

Apomyoglobin belongs to the globin fold family which counts several bacterial toxin domains as members. Its interaction with membranes shares some characteristics with that of the translocation domain of diphtheria toxin. It is a pH-dependent two-step process (binding and insertion) which requires the accumulation of a partially unfolded state. The protein parts involved in each step have been identified using Hydrogen/Deuterium exchanges analyzed by mass spectrometry. An amphipathic helix allows the membrane binding, and a hydrophobic helix is involved in the insertion step. The last helix becomes available upon formation of the partially folded state.